

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Anežka Tichá

ÚČINKY ANALOGŮ PEPTIDU UVOLŇUJÍCÍHO PROLAKTIN (PrRP) A NEUROPEPTIDU FF
(NPFF) *IN VITRO* A *IN VIVO*

Effects of PrRP (prolactin-releasing peptide) and NPFF (neuropeptide FF) analogs *in vitro*
and *in vivo*

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze.....

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

V úvodu své práce bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha, v.v.i.) za odborné vedení při experimentální činnosti a za konzultace a obětavou pomoc při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své vedoucí práce, doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. (Katedra biochemie, PřF UK).

Dále bych ráda poděkovala Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. za jodaci peptidů, Zuzaně Demianové, PhD. za proměření MS spektra a celému kolektivu Dr. Jiřího Jiráčka za pomoc při experimentální činnosti a za vytvoření milého pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za umožnění studia a jejich velkou podporu při něm.

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením grantu GAČR P303/10/1368 a RVO: 61388963 (AV ČR).

ABSTRAKT

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) a neuropeptid FF (NPFF) patří do skupiny RF-amidů. Tyto peptidy se vyznačují stejnými C-koncovými aminokyselinovými sekvencemi (R-F-NH₂) a podobnými biologickými aktivitami. PrRP byl objeven jako endogenní ligand sirotčího receptoru GPR10, který byl schopen vyvolat uvolňování prolaktinu *in vitro* a *in vivo*, avšak brzy bylo zjištěno, že to není primární funkcí tohoto peptidu. Jelikož se PrRP a GPR10 nachází v částech mozku, které jsou zodpovědné za regulaci příjmu potravy a protože se u myši s vyřazeným genem pro GPR10 nebo PrRP objevuje hyperfagie a obezita, je PrRP pokládán za anorexigenní peptid.

V této studii byl zkoumán vztah mezi PrRP a NPFF ve vazebných testech a spouštění buněčné signalizace MAPK/ERK1/2 *in vitro* a *in vivo* v testu příjmu potravy a analgetickém testu na myších.

V *in vitro* experimentech bylo prokázáno, že PrRP se váže k potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, která obsahuje GPR10 receptor, s velkou afinitou. Oproti tomu NPFF, jeho stabilní analog 1DMe a antagonist RF9 se k receptoru GPR10 nevázaly až do koncentrace 10⁻⁵ M. NPFF, 1DMe a PrRP se vázaly na membrány buněk CHO-K1 s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem s vysokou afinitou, avšak RF9 se vázal s afinitou nízkou, řádově 10⁻⁷ M, oproti tvrzením publikovaným v literatuře.

In vivo experimenty s hladovými myšmi samci prokázaly, že centrální podání PrRP a NPFF signifikantně snížilo příjem potravy, ale nemělo žádný signifikantní algesický efekt testu na horké plotně.

Antagonista receptoru NPFF₂, RF9, nebyl schopen *in vivo* inhibovat účinky PrRP a NPFF na příjem potravy, pravděpodobně kvůli jeho nízké afinitě k receptoru NPFF₂.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Peptid uvolňující prolaktin, neuropeptid FF, antagonist RF9, příjem potravy

ABSTRACT

Prolactin-releasing peptide (PrRP) and neuropeptide FF (NPFF) belong to the RF-amide family. These peptides have identical C-terminal amino acid sequence (R-F-NH₂) and similar biological activities. PrRP was identified as an endogenous ligand of an orphan receptor GPR10 able to stimulate PRL-secretion *in vitro* and *in vivo*, but soon it was discovered that this is not the primary function of this peptide. PrRP is thought to be an anorexigenic peptide as PrRP and GPR10 are found in several parts of the brain responsible for food intake regulation and because both GPR10 and PrRP deficient mice suffer from hyperphagia and late-onset obesity.

In this study, relationship between PrRP and NPFF was studied using both *in vitro* binding and cell signaling and *in vivo* food intake and analgesia test in mice.

In vitro experiments showed that PrRP bound to rat pituitary RC-4B/C cells containing GPR10 receptor with high affinity and NPFF, its stable analog 1DMe and its antagonist RF9 up to 10⁻⁵ M concentration did not bind to GPR10. NPFF, 1DMe and PrRP were bound to cell membranes with transfected NPFF₂ receptor with high affinity, but RF9 with low affinity in a range of 10⁻⁷ M, in contrast to published literature.

In vivo experiments with fasted mice confirmed that centrally injected PrRP and NPFF significantly lowered food intake and had a non-significant analgesic effect in hot plate test.

NPFF₂ antagonist RF9 was not able to inhibit *in vivo* effects of PrRP and NPFF on food intake probably due to the low affinity to NPFF₂ receptor. (In Czech)

KEY WORDS:

Prolactin-releasing peptide, neuropeptide FF, antagonist RF9, food intake

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD	1
1.1 OBEZITA.....	1
1.2 RF-AMIDY	1
1.2.1 RF-amidy.....	1
1.2.2 Receptory pro RF-amidy.....	2
1.3 PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN (PrRP)	2
1.3.1 Objev a struktura.....	2
1.3.2 Receptor pro PrRP	3
1.3.3 Výskyt PrRP v organismu.....	4
1.3.4 Výskyt GPR10 v organismu.....	4
1.3.5 Funkce PrRP v organismu.....	4
1.3.5.1 Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů.....	5
1.3.5.2 Působení PrRP na regulaci příjmu potravy.....	5
1.3.5.2.1 Myši s modifikovaným genem pro PrRP či GPR10	6
1.3.6 Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP.....	7
1.4 NEUROPEPTID FF.....	8
1.4.1 Objev a struktura.....	8
1.4.2 Receptory pro NPFF	9
1.4.3 Funkce NPFF	9
1.4.3.1 Funkce NPFF v opioidním systému	9
1.4.3.1 Vliv NPFF na regulaci příjmu potravy	10
1.4.4 Analogy NPFF	10
1.5 VZTAH MEZI PrRP A NPFF.....	11
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODY	13
3.1 MATERIÁL.....	13
3.1.1 Chemikálie	13
3.1.2 Materiály	14
3.1.3 Přístroje	14
3.1.4 Peptidy	15
3.1.4.1 Jodace peptidů	15
3.2 POKUSY <i>IN VITRO</i>	16
3.2.1 Pěstování buněčné hypofyzární linie RC-4B/C.....	16

3.2.2 Izolace mozkových membrán z potkaních hypotalamů	16
3.2.3 Vazebné experimenty	17
3.2.3.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů na buňkách RC-4B/C	17
3.2.3.2 Saturační vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C	18
3.2.3.3 Saturační vazebné experimenty na membránách z potkaních hypotalamů	18
3.2.3.4 Saturační vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF ₂	19
3.2.3.5 Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C	19
3.2.3.6 Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF ₂	19
3.2.4 Spouštění signální dráhy účinkem PrRP20, NPFF a jeho analogů	20
3.2.4.1 Sběr vzorků	20
3.2.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS prostředí	20
3.2.4.3 Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu	21
3.2.4.4 Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně	21
3.2.5 Vyhodnocení <i>in vitro</i> experimentů	22
3.3 POKUSY <i>IN VIVO</i>	23
3.3.1 Experimentální zvířata	23
3.3.2 Zavedení kanyly do třetí mozkové komory	24
3.3.4 Test příjmu potravy	24
3.3.5 Test analgetických účinků pomocí testu „hot plate“	25
3.3.6 Statistické vyhodnocení <i>in vivo</i> experimentů	25
4. VÝSLEDKY	26
4.1 POKUSY <i>IN VITRO</i>	26
4.1.1 Peptidy	26
4.1.1.1 Jodace peptidů	26
4.1.2 Pěstování hypofyzární buněčné linie RC-4B/C	26
4.1.3 Izolace mozkových membrán z potkaních hypotalamů	27
4.1.4 Detekce receptoru pro PrRP (GPR10) a receptoru NPFF ₂ na hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a na membránách z potkaních hypotalamů	27
4.1.5 Vazebné experimenty	28
4.1.5.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů	28
4.1.5.1.1 Závislost vazby Tyr ¹ NPFF k buňkám RC-4B/C na teplotě a době inkubace	28
4.1.5.1.2 Závislost vazby Tyr ¹ NPFF k buňkám RC-4B/C na použitém inhibitoru proteas.	29
4.1.5.1.3 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na době inkubace	31
4.1.5.1.4 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na složení vazebného pufru	33
4.1.5.1.5 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na použitém inhibitoru proteas.	34
4.1.5.1.6 Optimální vazebné podmínky pro Tyr ¹ NPFF a 1DMe	36
4.1.5.2 Saturační vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C	36

4.1.5.3 Saturační vazebné experimenty na membránách z potkaních hypotalamů.....	37
4.1.5.4 Saturační vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF ₂	38
4.1.5.5 Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C	39
4.1.5.6 Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF ₂	41
4.1.6 Fosforylace MAPK/ERK1/2 po působení PrRP20 a analc linie RC-4B/C.....	41
4.1.7 Shrnutí výsledků <i>in vitro</i> experimentů	43
4.2 POKUSY <i>IN VIVO</i>	44
4.2.1 Ovlivnění příjmu potravy po ICV podání PrRP20 a analogů NPFF.....	44
4.2.2 Analgetické účinky PrRP20 a analogů NPFF	47
5. DISKUZE	48
5.1 POKUSY <i>IN VITRO</i>	48
5.2 POKUSY <i>IN VIVO</i>	50
6. ZÁVĚR	52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACR – Nucleus arcuatus

ACTH – Adrenokortikotropní hormon

AgRP – Agouti-related peptide

AP – Area postrema

APS – Persíran amonný

BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)

BSA – Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)

CART – Cocaine and amphetamine regulated transcript

CCK - Cholecystokinin

CHO - Chinese hamster ovary

CNS – Centrální nervová soustava

CRH - Kortikoliberin

DMEM – Dulbecco's modified Eagle Medium

DMN – Dorsomediální jádro

EGF – Epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)

FBS – Fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)

FSH – Folikuly stimulující hormon

GIT – Gastrointestinální trakt

GPR10 – Receptor spojený s G proteinem (G-protein coupled receptor)

HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonová kyselina)

ICV podání – Podání do třetí mozkové komory (Intracerebroventrikulární)

IP podání – Nitrobřišní podání (intraperitoneální)

LHA – Laterální hypotalamická oblast

KO – Obecný termín pro jakýkoliv vyřazený gen (knock-out)

MAPK/ERK1/2 – Mitogenem aktivovaná proteinkináza/extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza 1/2

MCH – Melanin koncentrující hormon (Melanin Concentrating hormone)

ME – Eminencia mediana

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NPAD – Neuropeptid AF
NPFF – Neuropeptid FF
NPY – Neuropeptid Y
NTS – Nucleus tractus solitarius
PAGE – Polyakrylamidový gel
PEI – Polyethylenimin
POMC – Proopiomelanokortin
PRL – Prolaktin
PrRP – Peptid uvolňující prolaktin (Prolactin-Releasing Peptide)
PVDF – Polyvinyliden difluorid
PVN – Paraventriculární jádro
SDS – Dodecylsulfát sodný
S.E.M. – Střední chyba průměru (Standard Error of the Mean)
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TRH – Tyreoliberin (Thyrotropin-Releasing Hormone)
TSH – Tyreotropin (Thyroid-Stimulating Hormone)
UCP-1 – Uncoupling protein 1
UHR-1 – Potkaní analog receptoru pro PrRP (Unknown hypothalamic receptor-1)
VLRN – Ventrolaterální retikulární jádro
VMN – Ventromediální jádro

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 OBEZITA

Příčinou nadváhy a obezity je nadměrné ukládání tělesného tuku v organismu. K důvodům vzniku obezity se řadí především stravovací a pohybové návyky, pokud dochází k dlouhodobé pozitivní energetické bilanci, tj. konzumace potravin s vysokým obsahem kalorií a nízký energetický výdej zapříčiněný nedostatkem fyzické aktivity.

Kromě estetického problému způsobuje i vážné zdravotní komplikace, jako je např. *diabetes mellitus*, kardiovaskulární onemocnění apod. [1]. Dále se také u obézních pacientů častěji vyskytují některé druhy nádorových onemocnění (tlustého střeva, prsu, děložního čípku a dalších orgánů) [2].

Avšak i přes tyto četné zdravotní komplikace, které obezita způsobuje, neexistuje téměř žádná farmakoterapie, jedinou schválenou léčivou látkou na českém trhu je Orlistat (Xenical - Hoffman-La Roche, Alli - GlaxoSmithKline). Tato látka funguje na principu reverzibilní blokace střevní lipázy, čímž sice sníží množství vstřebávaných tuků z gastrointestinálního traktu asi o 1/3, ale zároveň způsobuje jako vedlejší efekt průjemy [3]. Nedostatek farmakoterapie k účinné léčbě obezity je způsoben složitostí procesů regulujících příjem potravy, kterým je nutné pro efektivní léčbu porozumět. Tyto procesy jsou ovlivňovány odpovědí mozku na velké množství signálů jak z periferie, tak z jiných oblastí CNS. Díky těmto signálům získává mozek informace o nutričním a energetickém stavu organismu a umožňuje mu regulovat příjem potravy podle aktuálních potřeb. Mezi nejdůležitější centra účastníci se regulace příjmu potravy patří hypotalamus [4].

1.2 RF-AMIDY

1.2.1 RF-amidy

RF-amidy jsou neuropeptidy, jejichž typickým znakem je zakončení C-konce sekvencí Arg-Phe-NH₂, která je nezbytná pro vazbu na receptory RF-amidů. Tyto peptidy byly poprvé objeveny v nervovém systému měkkýšů, konkrétně u škeble *Macrocallista*

nimbosa, a následně byl jejich výskyt prokázán u mnoha dalších bezobratlých živočichů. Poté byly objeveny u obratlovců peptidy podobné tetrapeptidu nalezenému u měkkýšů (FMRF-NH₂) pomocí protilátek proti tomuto tetrapeptidu, avšak identifikace a zjištění jejich významu trvalo déle [5]. Jako první byl izolován z kuřecího mozku peptid LPLRF-NH₂ [6].

V savčím genomu bylo doposud objeveno 5 genů kódujících RF-amidy, z jejichž primárních transkriptů vzniká posttranskripčními úpravami více různých peptidů. Savčí peptidy, které patří mezi RF-amidy jsou: neuropeptid FF (NPFF) a neuropeptid AF (NPAF), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), RFRP-1 (NPSV), RFRP-3 (NPVF), metastin a 26RF-NH₂.

RF-amidy ovlivňují velké množství životních funkcí, např. vnímání bolesti, působí na kardiovaskulární systém, sekreci různých hormonů apod. Další významnou funkcí těchto peptidů je vliv na příjem potravy a energetickou rovnováhu [5, 6].

1.2.2 Receptory pro RF-amidy

Receptory savčích RF-amidů se řadí mezi receptory spřažené s G-proteiny. Jelikož všechny RF-amidy obsahují stejný strukturní motiv na C-konci, mohou se na receptor pro daný RF-amid vázat i ostatní RF-amidy. Vysokou selektivitu má zachovanou hlavně receptor GPR10, na který se váže pouze PrRP. Oproti tomu bylo dokázáno, že např. na receptor pro NPFF se váží savčí RF-amidy s afinitou v řádu 10⁻⁸ M (NPFF se váže s afinitou 10⁻⁹ M) [7].

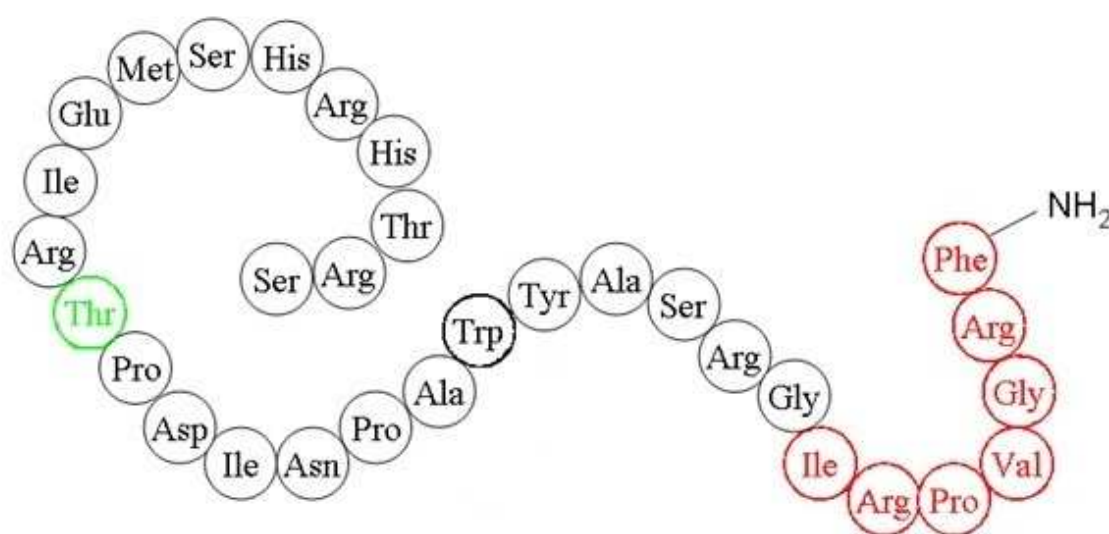
1.3 PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN (PrRP)

1.3.1 Objev a struktura

Peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*, PrRP) byl objeven v roce 1998 při hledání faktoru ovlivňujícího sekreci prolaktinu metodou tzv. obrácené farmakologie, kdy byl hledán endogenní ligand k sirotčímu receptoru GPR10 (jiné označení hGR3 - lidský receptor, či UHR-1, který je potkaním analogem GPR10). Při izolaci tohoto ligandu z extraktu z hovězího hypotalamu bylo zjištěno, že se tento peptid v organismu nachází ve dvou isoformách vznikajících z jednoho prepropeptidu [8]. Struktura prepropeptidu je

téměř stejná u různých živočišných druhů, ale liší se svojí délkou (98 aminokyselin u skotu, 87 u člověka, 83 u krys a 82 u myši). Ze zachování primární struktury tohoto peptidu u různých živočišných druhů lze předpokládat, že PrRP má v organismu důležitou úlohu [9], ovšem jeho fyziologická funkce může být u různých druhů rozdílná [10].

Protože prepropeptid obsahuje dvě štěpná místa, posttranslačními modifikacemi z něj vznikají dva peptidy lišící se svojí délkou: peptid složený z 31 aminokyselin (PrRP(1-31); PrRP31) a peptid s 20 aminokyselinami (PrRP(12-31); PrRP20) [8]. Struktura PrRP je zobrazena na obrázku (Obr. 1).



Obr. 1 Lidský analog PrRP31

PrRP20 má N-konec na threoninu v pozici 20, který je označen zeleně. Červeně jsou označeny aminokyseliny důležité pro správnou funkci PrRP.

1.3.2 Receptor pro PrRP

Receptor pro PrRP (GPR10) byl objeven v roce 1995. Jeho primární struktura je tvořena 369 aminokyselinami, které tvoří sedm hydrofobních úseků procházejících membránou, což je charakteristický rys receptorů spřažených s G-proteinem. Strukturně nejbližší je receptoru pro neuropeptid Y (NPY) [11]. Je pravděpodobné, že se tyto receptory vyvinuly z jednoho původního receptoru [12].

1.3.3 Výskyt PrRP v organismu

Neurony produkující PrRP se u savců vyskytují především v nucleus tractus solitarii (NTS) a ve ventrolaterálním retikulárním jádru (VLRN), nacházejících se v prodloužené míše, a dále lze tyto neurony najít v hypothalamu: v paraventriculárním jádru (PVN) a dorsomediálním jádru (DMN) [10, 13]. Méně rozšířené jsou tyto neurony v předním i zadním laloku hypofýzy a v amygdale. Mimo CNS se PrRP vyskytuje také v krvi, dření nadledvin, slinivce břišní, varlatech, nadvarlatech, placentě [10], tenkém a tlustém střevě [14, 15], avšak ve výrazně nižších koncentracích než v mozku [10]. Nebyl pozorován rozdíl v množství neuronů produkujících PrRP u samců a samic [13], ani rozdíl mezi různými živočišnými druhy ve výskytu PrRP [14, 15].

U samic bylo objeveno zvýšené množství mRNA pro PrRP po podání estradiolu a dále je zvýšená transkripce mRNA pro PrRP u samic v proestru (folikulární fáze pohlavního cyklu), kdy dochází ke zvýšené produkci estrogenu [16, 17].

1.3.4 Výskyt GPR10 v organismu

Receptor pro PrRP je v mozku velmi rozšířený, nachází se na více místech než PrRP. Neurony s GPR10 se vyskytují hlavně v retikulární jádru thalamu, v hypothalamu v PVN, periventriculárním jádru (PerVN), DMN, ventromediálním jádru (VMN), adenohypofýze, v amygdale, v NTS, v mozkovém kmeni v area postrema a ve VLRN [8, 18, 19]. V periferních tkáních byla mRNA pro GPR10 objevena pouze v dření nadledvin [10]. Bylo zjištěno, že samice mají proti samcům zvýšený počet receptorů GPR10 [20].

1.3.5 Funkce PrRP v organismu

PrRP ovlivňuje mnoho různých fyziologických procesů v organismu. Jako první bylo zjištěno, že způsobuje zvýšení sekrece prolaktinu [8]. V dalších studiích se však ukázalo, že ačkoli se PrRP vyskytuje i u samců, nemá u nich na vylučování prolaktinu žádný vliv, z čehož vyplývá, že uvolňování prolaktinu patrně není primární funkcí PrRP [20]. Intracerebroventrikulární (ICV) podání způsobuje sekreci dalších hypofyzárních hormonů, jako jsou adrenokortikotropní hormon (ACTH), oxytocin, vasopresin a luteinizační/folikulostimulační hormon [10].

Jelikož byl PrRP objeven v částech mozku důležitých pro udržování energetické rovnováhy jako jsou PVN a DMN, začal být považován za možný faktor ovlivňující příjem potravy [21]. Z výskytu PrRP a jeho receptoru GPR10 v dalších částech mozku lze předpokládat, že PrRP má vliv také na regulaci odpovědi na stres, bolestivé podněty apod. [10].

1.3.5.1 Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů

Neurony exprimující PrRP a GPR10 se nachází také v některých částech mozku účastnících se odpovědi na bolestivé podněty jako je parabrachiální jádro nebo centrální amygdala. Tyto neurony dále vylučují i enkefaliny, které svojí vazbou na opioidní receptory tlumí bolestivé podněty [22], a proto je možné předpokládat, že receptor GPR10 může být zahrnut v regulaci exprese proenkefalinu [23].

K objasnění vztahu PrRP a GPR10 k opioidnímu systému byly provedeny pokusy na myších s vyřazeným receptorem GPR10. Těmito testy bylo prokázáno, že systém PrRP-GPR10 ovlivňuje různé účinky opiátů. Myši s vyřazeným receptorem GPR10 měly vyšší práh vnímání bolesti, byla u nich pozorována vyšší analgesie způsobená stresem a snížená tolerance na morfin. ICV podání PrRP způsobilo hyperalgezi (vyšší vnímání bolestivých podnětů) a u jedinců s receptorem GPR10 byl zrušen analgetický účinek morfinu. Tím bylo prokázáno, že PrRP je fyziologickým antagonistou opiátového systému [23].

1.3.5.2 Působení PrRP na regulaci příjmu potravy

Oblasti mozku zodpovědné za řízení energetické rovnováhy jsou především hypothalamická jádra a mozkový kmen. Do hypothalamického PVN vstupuje populace primárních neuronů z nucleu arcuatu (ARC), které produkují anorexigenní peptidy proopiomelanokortin (POMC) a CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) a populace primárních neuronů produkujících orexigenní peptidy NPY a Agouti-Related Peptide (AgRP). Účinkem těchto peptidů v PVN pak dochází k uvolňování dalších anorexigenních peptidů, např. kortikoliberinu (CRH), tyreoliberinu (TRH) a oxytocinu [24]. Obě populace neuronů z ARC ústí také do DMN. V DMN je mnoho nervových zakončení neuronů tvořících orexigenní peptidy, avšak při jeho poničení dochází k hyperfagii

(přejídání) a obezité [1]. Tzv. centrem hladu je laterální hypotalamická oblast (LHA), do které vstupují obě populace neuronů z ARC. Z LHA jsou dekretovány další orexigenní peptidy, např. melanin koncentrující hormon (MCH) nebo orexin. Je zřejmé, že ARC má významný vliv na regulaci příjmu potravy, jelikož vysílá do CNS signály, které do něj přichází z periferie. Poškození tohoto jádra (např. glutamátem sodným) má za následek hyperfagii a obezitu [1]. V PVN je produkován také PrRP.

ICV podání PrRP způsobilo u potkanů snížení příjmu potravy, které bylo dále příčinou snížení hmotnosti [21], avšak nemělo žádný vliv na příjem vody nebo chování testovaných zvířat. Dále nebyla pozorována ani nevolnost, ani nechutenství, které někdy bývají nežádoucím vedlejším účinkem látek snižujících příjem potravy [25].

Anorexigenní účinky PrRP byly prokázány i dalšími experimenty, kdy bylo potkanům podáno takové množství potravy, jaké bylo zkonsumováno potkany, kterým byl ICV podán PrRP. U potkanů, kterým bylo podáno PrRP, došlo k vyšší redukci tělesné hmotnosti, což dokazuje, že PrRP nemusí ovlivňovat pouze množství přijímané potravy, ale pravděpodobně také zvyšuje energetický výdej. Tento fakt také nepřímo potvrzuje zvýšení tělesné teploty a spotřeby kyslíku, ke kterému došlo po podání PrRP [21].

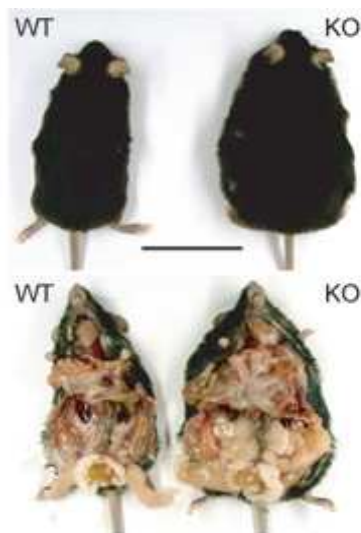
Aditivní efekt k účinku PrRP má společné podání s leptinem, periferním hormonem regulujícím dlouhodobě energetickou bilanci a působícím zejména v hypotalamu [26].

1.3.5.2.1 Myši s modifikovaným genem pro PrRP či GPR10

K dalšímu objasnění úlohy PrRP a GPR10 v organismu byly také použity geneticky modifikované myši, kterým byla pozměněna DNA kódující PrRP či receptor GPR10 využitím cílených vektorů, které v DNA nahradí původní geny pro PrRP nebo GPR10 [27].

Vyřazení genu pro GPR10 (tzv. knock-out, KO) způsobilo u myší vyšší tělesnou hmotnost, obezitu a glukosovou intoleranci. U samic byl snížen energetický výdej, což vedlo k větší obezitě než u samců. Dále bylo pozorováno, že u těchto myší neměl vliv na příjem potravy ani cholecystokinin (CCK), peptid vylučovaný z periferie i CNS, který způsobuje krátkodobé snížení příjmu potravy. To dokazuje, že by se PrRP přes receptor GPR10 mohl účastnit přenosu signálu CCK navozujícímu pocit sytosti po příjmu potravy [28].

U myší, kterým byl vyřazen gen pro PrRP, se v dospělosti objevuje hyperfagie, obezita a glukosová intolerance společně s inzulínovou rezistencí [29]. Na obrázku (Obr. 2) jsou znázorněny myši s funkčním (WT) a vyřazeným (KO) genem pro PrRP. Z obrázku je zřejmé, že PrRP KO myši jsou obéznější než myši produkující PrRP.



Obr. 2 Myši s modifikovaným genem pro PrRP [30]

WT (wild type) - jedinci, kterým nebyl pozměněn gen pro PrRP

KO (knock-out) - jedinci s modifikovaným genem

1.3.6 Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP

Přirozenými analogy PrRP v organismu jsou dvě formy lišící se v délce aminokyselinového řetězce, a to PrRP20 a PrRP31. Tyto dva peptidy mají srovnatelnou afinitu k receptoru GPR10 a neliší se ani svojí biologickou aktivitou *in vitro* a *in vivo* [8].

Nejkratším analogem, který zachovává plnou biologickou aktivitu PrRP31 *in vitro*, je PrRP(19-31), tzv. PrRP13 [31], avšak v dalších pokusech bylo zjištěno, že má nižší afinitu k receptoru GPR10 a má také sníženou biologickou aktivitu *in vitro* i *in vivo* [32]. Na obrázku je zobrazena struktura PrRP13 (Obr. 3, strana 8).

Nejkratším peptidem s alespoň částečně zachovanou afinitou k receptoru GPR10 je heptapeptid PrRP(25-31) [31, 33].

Aby byla zachována správná funkce PrRP, nesmí být zaměněn arginin v pozici 30. Jeho modifikace nebo záměna za jinou aminokyselinu způsobila úplnou ztrátu vazby na receptor i ztrátu biologické aktivity. K zajištění sterické specifity PrRP je nutné, aby se

v pozici 31 nacházel fenylalanin, nebo jiná aminokyselina obsahující aromatickou skupinu vázanou na minimálně jedné CH_2 skupině [32, 34].



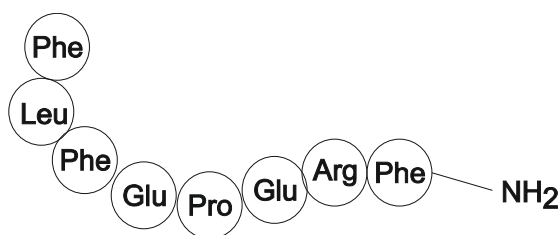
Obr. 3 Primární struktura PrRP(19-31)

Aminokyseliny nezbytné pro správnou biologickou funkci jsou zobrazeny červeně.

1.4 NEUROPEPTID FF

1.4.1 Objev a struktura

Neuropeptid FF (NPFF) byl poprvé izolován z hovězího mozku v roce 1985 reakcí s antisérem proti prvnímu objevenému RF-amidu, FMRF- NH_2 . Bylo zjištěno, že tento peptid se v organismu vyskytuje ve formě oktapeptidu a oktadekapeptidu (Obr. 4). Fyziologicky účinnějším se ukázal být oktapeptid [35]. NPFF patří do systému neuropeptidů, který zahrnuje množství endogenních ligandů různých živočišných druhů. Tento systém obsahuje dva prekurzory (pro-NPFF_A a pro-NPFF_B), z prekurzoru pro-NPFF_A vznikají proteolytickým štěpením NPFF, NPAF a NPSF, zatímco z pro-NPFF_B vzniká NPVF. Všechny tyto ligandy mají společný strukturní motiv na C-konci, a to PQRF- NH_2 [36].



Obr. 4 Primární struktura oktapeptidu neuropeptidu FF

1.4.2 Receptory pro NPFF

Funkce neuropeptidu FF je spojena s dvěma typy receptorů - NPFF₁ receptor a NPFF₂ receptor. Oba receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Jejich struktura je z 50% identická a je také velmi podobná receptoru pro neuropeptid Y a orexin (30-35 % podobností). Velká podobnost těchto dvou receptorů významně ztěžuje snahy o navržení selektivního ligandu pouze jednoho receptoru a minimalizaci interakcí s ostatními receptory RF-amidů [36].

Receptory NPFF₂ se nacházejí v prodloužené míše, talamu a hipokampu [37]. Receptory NPFF₁ se vyskytují v oblasti talamu a hypotalamu, avšak nejsou v míše [37].

K receptoru NPFF₁ mají větší afinitu neuropeptidy vzniklé štěpením prekurzoru NPFF_B, k receptoru NPFF₂ neuropeptidy vzniklé z prekurzoru NPFF_A [36].

1.4.3 Funkce NPFF

Výskyt mRNA pro receptory NPFF₁ a NPFF₂ v míše, laterálním hypotalamu a talamu ukazuje, že se NPFF účastní regulace odpovědi na bolestivé podněty. Struktura obou receptorů, podobná receptorům pro orexin, NPY a cholecystokininu zase poukazuje na možný vliv na příjem potravy. Další výzkumy také tvrdí, že NPFF ovlivňuje vylučování inzulinu, paměť, regulaci krevního tlaku a elektrolytickou rovnováhu organismu. Tak široká škála účinků naznačuje, že NPFF působí i přes jiné receptory než jen přes NPFF₁ a NPFF₂ receptor, nebo že stimulace NPFF receptorů v různých tkáních spouští různé procesy, které jsou nezávislé na místě účinku [38].

1.4.3.1 Funkce NPFF v opioidním systému

ICV podání NPFF myším snížilo analgetické účinky morfinu a také snížilo práh vnímání bolestivých podnětů, což odhalilo, že NPFF má zřejmě anti-opioidní účinky. To dokazuje také fakt, že ICV podání antiséra proti NPFF zvýšilo analgezii způsobenou opiáty a obnovilo citlivost na morfin u myší, které již byly k jeho analgetickým účinkům tolerantní. Proti tomu však intratekální podání (podání do prostoru mezi mozkem nebo míchou a mozkomíšními obaly) NPFF zvýšilo analgetický efekt morfinu, navíc po tomto

podání sám působil analgeticky [39]. Z toho vyplývá, že jeho vliv na opioidní systém závisí na místě podání, tj. jestli byl podán do míchy, nebo mozkových komor [40].

1.4.3.1 Vliv NPFF na regulaci příjmu potravy

Jelikož se ukázalo, že mnoho opioidních agonistů způsobuje zvýšení příjmu potravy, byl v této souvislosti zkoumán i NPFF [41]. Sledováním jeho účinků po ICV podání potkanům bylo prokázáno, že i on snižuje příjem potravy a zároveň výrazně zvyšuje příjem vody [42]. Protože patří mezi endogenní opioidní modulátory, je možné, že snížení příjmu potravy po ICV podání NPFF je způsobeno inhibicí endogenního opioidního systému. To potvrdil test, v kterém byl současně s NPFF podán naloxon, antagonist opioidního systému. Po jejich společném podání nebyl signifikantně zvýšen inhibiční efekt NPFF, z čeho lze usoudit, že mechanismus účinku NPFF může být stejný jako naloxonu a NPFF způsobuje snížení příjmu potravy inhibicí endogenního opioidního systému [41] a to hlavně receptoru μ (pro morfin) a receptoru κ (pro ketocyclazocin) [43]. Avšak NPFF se neváže přímo na opioidní receptory, ale jeho účinek je pravděpodobně způsobený ovlivněním účinků přirozených endogenních ligandů opioidního systému, konkrétně receptorů μ a κ [43].

1.4.4 Analogy NPFF

Pro provedení vazebných testů je nutné použít analog obsahující tyrosin, aby bylo možné ho jodovat. Za tímto účelem se často používá analog, ve kterém je nahrazen fenylalanin v pozici 1 tyrosinem, [Tyr¹]NPFF (Tyr¹NPFF) [44].

Pro zkoumání biologických funkcí NPFF je nutné použít agonistu, který je odolný vůči peptidasám, které způsobují jeho rychlou inaktivaci. Tento požadavek splňuje analog, který má L-fenylalanin v pozici 1 nahrazen D-tyrosinem a zároveň má N-methylovanou druhou peptidovou vazbu, [D-Tyr¹, (N-Me)-Phe⁴]NPFF (1 DMe). Tento analog má srovnatelnou afinitu k NPFF receptorům jako NPFF [44].

Strukturně-aktivitní studie s analogy NPFF vedly k syntéze několika kandidátů na antagonistu NPFF receptorů [40, 45], avšak žádný antagonist neprokázal velkou selektivitu a aktivitu [37]. Nedávno byly v několika studiích popsány biologické účinky nového analogu NPFF, N-adamantyl-Arg-Phe-NH₂ (RF9), který vykazuje možné antagonistické účinky vůči NPFF receptorům. Váže se k oběma NPFF receptorům s dobrou

afinitou (řádově desítky nM), avšak nevykazuje žádnou vazbu k ostatním receptorům RF-amidů ani k opioidním receptorům. Tyto výsledky naznačují, že by se mohlo jednat o selektivního antagonistu NPFF receptorů [46]. Tato vlastnost by byla velice důležitá k objasnění vztahů mezi peptidy NPFF systému a jemu podobných peptidů, jelikož většina ligandů RF-amidových receptorů vykazuje vlastnosti parciálních agonistů a zároveň mají nízkou afinitu ke svým receptorům [36]. Samotný RF9 nevykazuje žádnou biologickou aktivitu, avšak ruší zvýšení krevního tlaku a srdečního tepu způsobené NPFF [46]. Dále bylo popsáno, že RF9 inhibuje hypotermii způsobenou NPFF u myší [47-49] a algesii způsobenou NPFF u myší [47].

1.5 VZTAH MEZI PrRP A NPFF

Při testování vazby různých RF-amidů na receptor NPFF₂ bylo zjištěno, že PrRP31 a PrRP20 se vážou na tento receptor s afinitou o řád nižší než NPFF [7].

PrRP vykazuje vysokou vazebnou afinitu k receptorům NPFF, hlavně k NPFF₂ receptoru, ke kterému vykazuje desetkrát vyšší afinitu, než k NPFF₁ receptoru. Je tedy možné, že *in vivo* účinkuje také pomocí aktivace NPFF receptorů.

Centrální podání PrRP způsobuje zvýšení krevního tlaku stejně jako po ICV podání NPFF. Tento efekt může být zrušen působením RF9, avšak empirický antagonist GPR10 (inhibuje pouze některé účinky PrRP), neuropeptid Y (NPY), žádný vliv na tuto funkci PrRP neměl. Z těchto výsledků je možné usuzovat, že PrRP působí na kardiovaskulární systém přes receptory NPFF, ne GPR10 [50].

2. CÍLE PRÁCE

- 1) *In vitro*: ověřit vazbu PrRP, NPFF a jeho antagonisty RF9 na buňky hypofyzární buněčné linie RC-4B/C a buněčné membrány obsahující receptor GPR10 nebo NPFF₂ a testovat signalizaci do buněk působením PrRP a analogů NPFF na buňkách RC-4B/C.
- 2) *In vivo*: určit vzájemný vztah PrRP a NPFF s využitím antagonisty NPFF₂ receptoru RF9 po centrálním podání myším kmene C57Bl/6 z hlediska vlivu na příjem potravy a analgesii.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Aminkyseliny	Iris Biotech, Marktredwitz, Německo
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bromfenolová modř	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Complete	Roche Diagnostic, Nonnenwald, Germany
DMEM - <i>high glucose</i> (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
5,5'-dithiobisnitrobenzoová kyselina (DTNB)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Duracrol	Spofa – Dental, ČR
Epidermální růstový faktor (EGF)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fetální hovězí sérum (FBS) Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
D-glukosa bezvodá	PENTA, Chrudim, ČR
L-glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Glycerin bezvodý	PENTA, Chrudim, ČR
Glycin	PENTA, Chrudim, ČR
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí pankreatický inhibitor proteas (BPTI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
KCl	Sigma, St. Louis, MO, USA

Koňské sérum (HS)	Invitrogen Grand Island, NY, USA
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Methanol	PENTA, Chrudim, ČR
MgCl ₂ hexahydrát	LACHEMA, Brno, ČR
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaCl	LACHEMA, Brno, ČR
Na ¹²⁵ I	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NaOH	PENTA, Chrudim, ČR
Na ₃ VO ₄	Sigma, St. Louis, MO, USA
Pefabloc	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Persíran amonný	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Polyethylenimin (PEI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trizma base Primary Standard and Buffer	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB
Tween-20	Serva GmbH, Heidelberg, Německo

3.1.2 Materiály

Nitrocelulózová membrána	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PVDF-Immobilon membrána	Sigma, St. Louis, MO, USA
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie
Buněčné membrány s transfektovaným lidským NPFF ₂ receptorem (RBHNF2M400UA)	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

3.1.3 Přístroje

Biohazardní box (EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí)
Brandelův přístroj (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MA, USA)
CCD kamera LAS-3000 (Fuji Photo Film GmBH, Düsseldorf, Německo)

Centrifuga HETTICH Univerzal 320 (Tuttlingen, Německo)

Centrifuga Jouan C3i/CR 3 (Jouan, Saint-Herblain, Francie)

CO₂ inkubátor (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko)

γ-čítač (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)

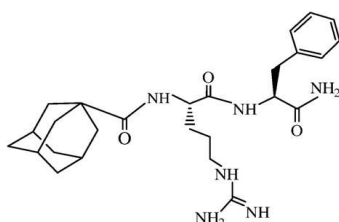
Mikroskop Stand Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Německo)

Ultracentrifuga Beckmann Optima™ L-00XP-Ultracentrifuga (Beckmann, Palo Alto, USA)

3.1.4 Peptidy

Peptidy byly syntetizovány metodou syntézy na pevné fázi v Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i., Praha na oddělení peptidové syntézy. Byl syntetizován PrRP(12-31) (PrRP20) a analogy NPFF [Tyr¹]NPFF (Tyr¹NPFF), [D-Tyr¹, (N-Me)-Phe]NPFF (1 DMe) a N-adamantyl-Arg-Phe-NH₂ (RF9). Sekvence těchto peptidů jsou na obrázku (Obr. 5).

- A) **T¹²-P-D-I-N-P-A-W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F³¹-NH₂**
- B) **Y-Q-A-F-L-F-Q-P-Q-R-F-NH₂**
- C) **D-Y-L-(N-Me)-F-Q-P-Q-R-F-NH₂**
- D)



Obr. 5 Primární struktura A) PrRP20, B) Tyr¹NPFF, C) 1DMe, D) RF9 [51]

3.1.4.1 Jodace peptidů

Jodace peptidů byla provedena podle postupů popsanych v práci [32]. S použitím Na¹²⁵I byly pomocí Iodo-genu radioaktivně značeny peptidy PrRP31, Tyr¹NPFF a 1DMe. Jodace byla provedena na oddělení Radioizotopů, ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha.

3.2 POKUSY *IN VITRO*

3.2.1 Pěstování buněčné hypofyzární linie RC-4B/C

Hypofyzární potkaní buněčná linie byla pěstována v CO₂ inkubátoru při 37°C v atmosféře obohacené 5% oxidu uhličitého. Buňky byly pěstovány v růstovém médiu DMEM, do kterého bylo přidáno 10% tepelně inaktivované fetální hovězí sérum (FBS), 2% glutamin a 1% penicilin/streptomycin. Dále bylo do média přidáváno 2,5 µg/ml epidermálního růstového faktoru (EGF).

Bylo prováděno pasážování po 3-4 dnech, v závislosti na počtu buněk.

K provedení kompetitivních vazebných testů byly buňky pěstovány na 24-jamkových destičkách (NuclonTM, NUNC, Roskilde, Dánsko). Na 6-jamkových destičkách (Lennox, Laboratory Supplies Ltd., IWAKI, Dublin, Irsko) byly pěstovány buňky, na nichž byla prokazována buněčná signalizace. Pro zajištění větší přilnavosti buněk ke dnu a větší odolnosti při provádění pokusu byla dna destiček potažena polyethyleniminem (PEI).

3.2.2 Izolace mozkových membrán z potkaních hypotalamů

Mozkové membrány byly izolovány z hypotalamů potkaních samců kmene Wistar starých 3 měsíce, které byly zamrazeny při -70°C [30]. 40 hypotalamů (přibližně 1,2 g tkáně) bylo homogenizováno v Teflon-glass homogenizéru při střední rychlosti ve 20 ml izolačního pufru (20 mM HEPES pH 7,4, Complete 1 tbl/50 ml pufru). Poté byla suspenze odstředěna (centrifuga Jouan C3i/CR 3, Saint-Herblain, Francie) při 1000 x g po dobu 5 minut při 4°C. Supernatant byl pak dále odstředěn (ultracentrifuga Beckmann L8-55, rotor Ti55,2) při 100000 x g po dobu 15 minut při 4°C, pelety byly rehomogenizovány v homogenizačním pufru (20 mM HEPES, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) a znovu odstředěny při 100000 x g po dobu 15 minut při 4°C (ultracentrifuga Beckmann). Následně byly pelety rehomogenizovány v homogenizačním pufru a alikvoty byly uchovány při -70°C. V těchto alikvotách byla stanovena koncentrace bílkovin podle Bradfordové [52]. Odpovídající koncentrace bílkovin byla odečtena z kalibrační křivky pro hovězí sérový albumin (BSA), měření bylo prováděno v duplikátech.

3.2.3 Vazebné experimenty

Pro vazebné pokusy byla buněčná linie RC-4B/C pěstována na 24-jamkových destičkách se dnem potaženým PEI. Buňky byly pěstovány do počtu 300-450 tisíc buněk/jamku.

Pokud byly vazebné testy prováděny na 24-jamkových destičkách (tj. testy prováděné na buňkách RC-4B/C), byla každá jamka před pokusem promyta promývacím pufrům (10 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂), stejně byly jamky promyty i po skončení inkubace. Následně byly buňky solubilizovány 15 minut v 0,1 M roztoku NaOH. Lyzáty buněk byly odebrány do plastových zkumavek a radioaktivita navázaná na buňkách byla proměřena na γ -čítači.

Při provádění vazebných pokusů ve zkumavkách (tj. testy s mozkovými membránami z potkaních hypotalamů, nebo s buněčnými membránami s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem) byl pokus po inkubaci ukončen rychlou filtrací na Brandelově přístroji přes GF/C filtr, který byl minimálně 30 minut předem ve promývacím pufru (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) s PEI (1g/200ml promývacího pufru). Radioaktivita navázaná na membránách byla proměřena na γ -čítači.

Všechny pokusy, kromě optimalizace podmínek, byly prováděny v duplikátech a nejméně třikrát opakovány.

3.2.3.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů na buňkách RC-4B/C

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny na základě principů Motulského a Neubiga [53]. Optimální vazebné podmínky pro vazbu PrRP20 na buňky RC-4B/C byly zjištěny v práci [32]. Pro zjištění optimálních vazebných podmínek pro vazbu analogů NPFF byl zkoumán vliv teploty, doby inkubace, složení vazebného pufru a použití inhibitorů proteolytických enzymů (proteas). Optimální podmínky pro vazbu Tyr¹NPFF i 1DMe byly zjišťovány za použití základního pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa. Stanovení optimálních podmínek vazby Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C probíhalo ve vazebném pufru 20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa. Ke stanovení totální vazby byl použit pouze radioligand daného peptidu o finální koncentraci 10⁻¹⁰ M, k určení nespecifické vazby byl vedle radioligandu přidán ještě neznačený peptid o finální koncentraci 10⁻⁵ M.

Pro stanovení optimálních podmínek pro vazbu Tyr¹NPFF byla vyzkoušena inkubace při 4°C po dobu 30, 60 a 90 minut, při 25°C po dobu 10, 25, 30, 45 a 90 minut. Dále byl zkoumán vliv použití inhibitorů proteas, rozdíl při použití BPTI (hovězí pankreatický inhibitor trypsinu) a inhibitoru Complete (směs inhibitorů proteas).

Ke zjištění optimálních podmínek pro vazbu 1DMe byla vyzkoušena inkubace při 25°C po dobu 60, 120 a 180 minut. Byl také zjišťován vliv přítomnosti EDTA (2 mM) a iontů Mg²⁺ (5 mM, MgCl₂) a Ca²⁺ (2 mM, CaCl₂) ve vazebném pufru a dále vliv inhibitorů proteas 0,1 mg/ml BPTI, Complete a Pefabloc (směs inhibitorů proteas) v koncentraci 0,1 mM a 1 mM.

Všechny testy proběhly 1 - 2x a byly prováděny v duplikátech.

3.2.3.2 Saturační vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C

Stanovení B_t bylo provedeno ve vazebném pufru (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa; saturace ¹²⁵I-Tyr¹NPFF 0,1 mg/ml BPTI, pro saturace ¹²⁵I-1DMe bez inhibitoru) s finálními koncentracemi ¹²⁵I-Tyr¹NPFF a ¹²⁵I-1DMe v rozmezí 0,5 - 5 nM v objemu 250 µl na jamku. Pro stanovení B_{nsp} byla do jamek pipetována příslušná koncentrace radioligandu ¹²⁵I-Tyr¹NPFF, nebo ¹²⁵I-1DMe a nezařazeného peptidu Tyr¹NPFF, nebo 1DMe s finální koncentrací 10⁻⁵ M. Poté byly destičky inkubovány za třepání 120 minut při 25°C.

3.2.3.3 Saturační vazebné experimenty na membránách z potkaních hypotalamů

Alikvoty membrán (kapitola 3.2.2) byly rozmrazeny a naředěny vazebným pufrům (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mg/ml BSA), aby výsledná koncentrace bílkovin byla 40 µg/zkumavku. Pro inkubaci byl použit vazebný pufr (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mg/ml BSA, 0,2 mg/ml Pefabloc, 0,1 mg/ml BPTI, 2 mM EDTA) a pro určení B_t ¹²⁵I-PrRP31 s finálními koncentracemi v rozmezí 0,5 - 5 nM. Pro stanovení B_{nsp} byl použit ¹²⁵I-PrRP31 s finálními koncentracemi v rozmezí 0,5 - 5 nM a nezařazený peptid PrRP20 s finální koncentrací 10⁻⁵ M (celkový objem 250 µl). Zkumavky byly dále inkubovány 60 min při 25°C za třepání.

3.2.3.4 Saturační vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF₂

Vazebné experimenty s membránami buněk CHO-K1 s transfektovaným receptorem NPFF₂ (Perkin Elmer, RBHNF2M400UA) probíhaly za podmínek doporučených výrobcem. Membrány byly naředěny vazebným pufr (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA), aby výsledná koncentrace bílkovin byla 3 µg/zkumavku. Vazebné pokusy byly provedeny podle návodu výrobce. Pro inkubaci byl použit vazebný pufr a pro určení B_t ¹²⁵I-1DMe s finálními koncentracemi v rozmezí 0,5 - 5 nM. Pro stanovení B_{nsp} byl použit ¹²⁵I-1DMe s finálními koncentracemi v rozmezí 0,5 - 5 nM a neznačený peptid 1DMe s finální koncentrací 10⁻⁵ M. Zkumavky byly inkubovány 60 min při 25°C za třepání.

3.2.3.5 Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C

Do všech jamek byl pipetován vazebný pufr (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 2 mM EDTA, 0,1 mg/ml BPTI pro ¹²⁵I-Tyr¹NPFF; bez inhibitorů proteas a bez MgCl₂ pro ¹²⁵I-1DMe; pro ¹²⁵I-PrRP31 20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI), neznačený peptid PrRP20 či analog NPFF s finální koncentrací v rozmezí 10⁻¹¹ až 10⁻⁴ M a ¹²⁵I-PrRP31, ¹²⁵I-Tyr¹NPFF nebo ¹²⁵I-1DMe s finální koncentrací 10⁻¹⁰ M. K určení totální vazby byl do jamky místo neznačeného peptidu přidán vazebný pufr. Následně byla destička inkubována při laboratorní teplotě 90 min pro kompetitivní vazebné testy s PrRP20 a 180 min pro vazebné testy s analogy NPFF.

3.2.3.6 Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF₂

Membrány buněk CHO-K1 s transfektovaným lidským receptorem NPFF₂ (Perkin Elmer, RBHNF2M400UA) byly naředěny 1:100 na výslednou koncentraci bílkovin 3 µg/zkumavku (kapitola 3.2.3.4). Vazebné testy byly provedeny podle návodu výrobce. Do každé zkumavky byl pipetován neznačený PrRP20, Tyr¹NPFF, 1 DMe nebo RF9 s finální koncentrací od 10⁻¹² do 10⁻⁵ M, vazebný pufr (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA), ¹²⁵I-1DMe s finální koncentrací 10⁻¹⁰ M a 100 µl membrán (celkový objem 250 µl). Následně byly zkumavky inkubovány 120 minut při 25°C na třepačce s vodou.

3.2.4 Spouštění signální dráhy účinkem PrRP20, NPFF a jeho analogů

3.2.4.1 Sběr vzorků

K prokázání spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 byly použity vzorky připravené z lyzátu buněk RC-4B/C pěstovaných na 6-jamkových destičkách, jejichž dno bylo potaženo PEI a průměr jamky byl 33 mm. Optimální hustota buněk byla 700-900 tisíc buněk na jamku.

17 hodin před sběrem vzorků bylo vyměněno růstové médium za médium bez séra a bez EGF. Do každé jamky byl pipetován příslušný analog NPFF, PrRP20, nebo jejich kombinace s RF9. V případě kombinace byl RF9 pipetován 10 minut před dalším peptidem. Finální koncentrace peptidů v jamce byla 10^{-4} až 10^{-6} M. Na buňky, které byly použity jako kontrola, nebyl aplikován žádný peptid. Obsah byl inkubován za stálého míchání 2 minuty při 37°C, pro samotné RF9 byla provedena inkubace i po dobu 12 minut, aby bylo možné porovnat signalizace samotných peptidů a peptidů podaných v kombinaci. Poté byla destička dána na led a všechny jamky byly třikrát promyty 3 ml promývacího pufru (PBS pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1,76 mM KH_2PO_4) o teplotě 4°C. Poté byla provedena solubilizace buněk ve vzorkovém pufru na SDS elektroforézu (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol, 50 mM NaF a 1 mM Na_3VO_4), lyzáty buněk byly odebrány do mikrozkupek a zamraženy v -20°C.

Všechny vzorky byly sbírány v duplikátech alespoň ve třech nezávislých pokusech.

3.2.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS prostředí

Elektroforéza v 5%/12% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Vzorky byly před aplikací na gel 1 minutu sonikovány, následně zahřívány 2 minuty při 100°C a nakonec centrifugovány 5 minut při 500 x g a 25°C. Jako pozitivní kontrola pro spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 byl použit PrRP20, u kterého bylo prokázáno spouštění této signální dráhy [32]. Pro detekci receptoru NPFF₂ byly jako pozitivní kontrola použity membrány s lidským NPFF₂, pro detekci receptoru pro PrRP byly jako pozitivní kontrola použity membrány s lidským receptorem pro PrRP (GPR10).

Elektroforéza probíhala ve dvou krocích za konstantního napětí, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté asi 60 minut při 170 V.

3.2.4.3 Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu

Metoda tzv. přenosu (z anglického „*blotting*“) proteinů z elektroforetických gelů na nitrocelulózové nebo PVDF membrány se nazývá Western blot. Pro stanovení signalizačních fosforylovaných proteinů ve vzorcích byly proteiny přeneseny z SDS-PAGE gelu na membránu ImmobilonTM-P PVDF (polyvinyliden difluorid) (Sigma-Aldrich, USA), pro stanovení GPR10 na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos probíhal v blotovacím pufru s pH 8,3 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin a 20% methanol) přes noc při 4°C za konstantního napětí 30 V.

3.2.4.4 Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně

Po přenesení proteinů byly membrány 5 minut promývány v promývacím TBS (*Tris-Buffered Saline*) pufru (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl a 0,1% Tween-20) a následně byly jednu hodinu za laboratorní teploty inkubovány v blokovacím pufru (5% odtučněné sušené mléko, 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5 mM Na₃VO₄ a 50 mM NaF). Poté byly membrány třikrát promyty promývacím TBS puftrem po 5 minutách. Promyté membrány byly 1 hodinu inkubovány s primární protilátkou ředěnou v blokovacím pufru. Seznam protilátek s příslušným ředěním je uveden v tabulce (Tab. 1, strana 22).

Poté byly membrány třikrát promyty promývacím puftrem TBS po dobu 5 minut a následně jednu hodinu inkubovány se sekundární protilátkou (Tab. 1, strana 22) značenou peroxidázou, která byla ředěna v blokovacím pufru. Dále byly membrány opět třikrát promyty promývacím puftrem TBS po 5 minutách. Pro působení roztoku Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) byla detekována chemiluminiscence pomocí CCD kamery LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Německo).

Tab. 1 Přehled protilátek používaných při detekci proteinů na PVDF membránách a nitrocelulózových membránách

Všechny protilátky byly ředěny v blokovacím pufru (viz kapitola 3.2.4.4)

Protilátka	Základní látka	Ředění
primární MAPK	<i>Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší Ab</i> (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)	1:2000
primární NPFF2	<i>Lidský-NPFF₂ Receptor králičí polyklonální Ab</i> (Abcam plc, Cambridge, UK)	1:100
primární GPR10	<i>Myší-GPR10 králičí polyklonální Ab</i> (Novus Biological, Littleton, CO, USA)	1:1000
sekundární proti myšímu IgG	<i>Peroxidázový konjugát připravený v koni</i> (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)	1:2000
sekundární proti králičímu IgG	<i>Peroxidázový konjugát připravený v koni</i> (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)	1:2000

3.2.5 Vyhodnocení *in vitro* experimentů

Vyhodnocení vazebných experimentů s analogy NPFF a PrRP20 bylo provedeno v programu Graph Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Vazebné křivky byly vyhodnocovány metodou nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa. K vyhodnocení spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 bylo použito denzitometrické stanovení pomocí programu Quantity One (BioRad, Hercules, USA).

Pro správné provedení vazebných experimentů musí být dosaženo rovnováhy mezi disociací a asociací komplexu ligand-receptor, což charakterizuje rovnovážná disociační konstanta K_d , jejíž hodnota vyjadřuje molární koncentraci ligandu, která způsobí obsazení poloviny všech receptorů. Čím nižší je K_d , s tím větší afinitou se ligand k danému receptoru váže [53].

$$\frac{[\text{ligand}] \times [\text{receptor}]}{[\text{ligand} - \text{receptor}]} = K_d$$

Pokud se radioligand váže na konkrétní receptor, jedná se o specifickou vazbu, B_{sp} . Pokud se váže např. na receptor, který není předmětem našeho zájmu, nebo na buněčnou membránu, jde o vazbu nespecifickou, B_{nsp} . B_{sp} a B_{nsp} dohromady tvoří vazbu celkovou, B_t , která představuje celkové množství navázaného radioligandu [53].

Ze saturační vazebných experimentů byla zjištěna hodnota K_d a B_{max} , která představuje celkový počet receptorů.

Z kompetitivních vazebných experimentů byla určena hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} , která představuje koncentraci, při které se neznáčený peptid váže právě na polovinu receptorů v přítomnosti radioligandu. Z této hodnoty byla pomocí rovnice Chenga a Prussofa vypočítána hodnota disociační konstanty neznáčené látky K_i [54].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}} [M]$$

Hodnota K_i představuje koncentraci neznáčeného ligandu, při které se v nepřítomnosti radioligandu nebo jiných kompetitorů váže na polovinu receptorů. Hodnota K_d je určena ze saturačních vazebných experimentů, prováděných za podobných podmínek jako kompetitivní vazebné pokusy [53], metodou nelineární regrese.

Vyhodnocení statisticky významné odpovědi u buněčné signalizace bylo provedeno metodou jednocestná ANOVA (*Analysis of variance*) s následným Dunnettovým post-hoc testem. Statisticky významná data byla, když $P < 0,05$.

Získané hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM) a jsou stanoveny alespoň ze tří nezávislých měření v duplikátu.

3.3 POKUSY *IN VIVO*

3.3.1 Experimentální zvířata

Ke všem pokusům byli použiti myši samci kmene C57Bl/6, kteří byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů Akademie věd v Krči při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$, měli volný přístup k potravě a pití, rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin, kdy začátek světla byl v 6:00. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a protokol pokusu byl schválen resortní komisí AVČR pro ochranu zvířat. Myši byly krmeny standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha,

ČR) obsahující 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků s energetickou hodnotou 3,4 kcal/g.

3.3.2 Zavedení kanyly do třetí mozkové komory

Tato metoda byla provedena podle postupů Maletínské a kol. [55]. Operovány byly myši ve věku 2-3 měsíců, které byly v průběhu operace v celkové anestezii (intraperitoneální (IP) injekce ketamin/xylazin: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu, Spofa, ČR). K fixaci hlavy byl použit stereotaxický přístroj a kanyla (Plastic One, Roanoke, VA, USA) byla zavedena do 3. mozkové komory (2 mm od bodu bregma v *anterior posteriori* směru, 3 mm ve vertikálním směru). Okolo kanyly byla aplikována dentální pryskyřice (Spofa-Dental, ČR) rozpuštěná v duracrolu (Spofa-Dental, ČR). Myší samec kmene C57Bl/6 s kanylou zavedenou do třetí mozkové komory je na obrázku (Obr. 6).

Po operaci byly myši umístěny do samostatných klecí a ponechány v klidu asi 3-4 dny po operaci.



Obr. 6 Myší samec kmene C57Bl/6 s kanylou zavedenou ve 3. mozkové komoře

3.3.4 Test příjmu potravy

Test, ve kterém byly zjišťovány změny v příjmu potravy po podání PrRP20, analogů NPFF a jejich kombinací, byl prováděn minimálně tři dny po zavedení kanyly. Před zahájením pokusu byly myši náhodně rozděleny do skupin po minimálně šesti jedincích.

V den pokusu byly myši 17 hodin hladové, ale s volným přístupem k pití. PrRP20 a analogy NPFF byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a injektovány těchto látek, jejich kombinací a fyziologického roztoku bylo prováděno pomocí infuzní pumpy. Peptidy byly

podávány v dávkách 10 nmol/myš (5 μ l/myš) a RF9 v dávce 30 nmol/myš (5 μ l/myš). Kombinované podání peptidů bylo provedeno tak, že se nejdříve podával RF9 v dávce 30 nmol/myš (5 μ l) a následně po 10 minutách byl podáván další peptid (PrRP20 nebo Tyr¹NPFF) v dávce 10 nmol/myš (5 μ l/myš). 15 minut po injekci byla myším podána předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy byl prováděn každých 30 minut po dobu 5 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě. Podání každého peptidu nebo jejich kombinací bylo prováděno alespoň dvakrát (n = 6 myši/skupinu).

Po ukončení pokusu byly myším odebrány mozky, aby bylo zkontrolováno, zda byla kanyla zavedena do třetí mozkové komory. Mozky byly krájeny na kryomikrotomu a řezy o tloušťce 20-30 μ m byly barveny kresylovou violetí.

3.3.5 Test analgetických účinků pomocí testu „hot plate“

Před pokusem měly myši volný přístup k potravě i pití. Test byl prováděn minimálně tři dny po zavedení kanyly.

Na horké plotně o teplotě 53°C („hot plate“, TSE systems, Bad Homburg, Německo) byl testován analgetický účinek podaných látek vyvoláním bolesti způsobené tepelným drážděním všech čtyř končetin. Peptidy byly myším podány stejně jako při testu příjmu potravy (kapitola 3.3.4).

3.3.6 Statistické vyhodnocení *in vivo* experimentů

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány v programu Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA) metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. Rozdíly v příjmu potravy a v chování při testu ve volném poli a testu na horké plotně mezi jedinci, jimž byl injektován fyziologický roztok, a jedinci, kterým byl podán daný peptid, byly považovány za statisticky významné, pokud $P < 0,05$.

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka.

4. VÝSLEDKY

4.1 POKUSY *IN VITRO*

4.1.1 Peptidy

Ověření molární hmotnosti syntetizovaných peptidů bylo provedeno na hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Byla prokázána shoda molární hmotnosti peptidů s teoretickou molární hmotností.

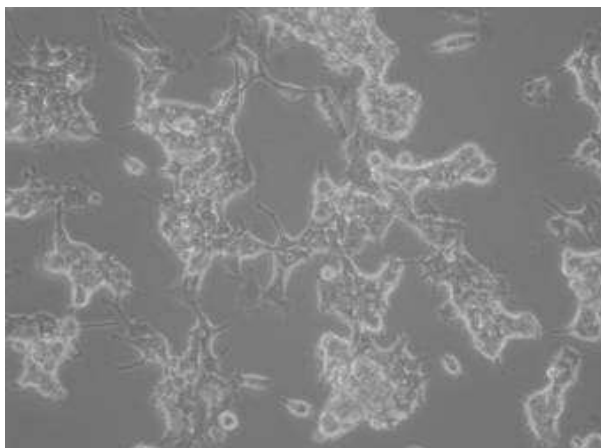
4.1.1.1 Jodace peptidů

Všechny peptidy byly značeny radioaktivním izotopem jódu ^{125}I .

PrRP31 byl značen na tyrozylovém zbytku v pozici 20. Tyr¹NPFF a 1DMe byly značeny na tyrozylovém zbytku v pozici 1.

4.1.2 Pěstování hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

Hypofyzární buněčná linie byla pěstována za konstantních podmínek popsaných v kapitole 3.2.1. Na obrázku (Obr. 7) jsou znázorněny typické tvary buněk hypofyzární buněčné linie RC-4B/C.



Obr. 7 Typické tvary buněk hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

Fotografie buněk byla pořízena po 48 hodinách růstu v kultivační láhvi s růstovým médiem se zvětšením 40x.

4.1.3 Izolace mozkových membrán z potkaních hypotalamů

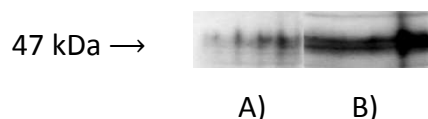
Byly izolovány mozkové membrány z potkaních hypotalamů dle postupu popsaného v kapitole 3.2.2.

4.1.4 Detekce receptoru pro PrRP (GPR10) a receptoru NPFF₂ na hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a na membránách z potkaních hypotalamů

Detekce receptorů GPR10 a NPFF₂ byla provedena metodou přenosu proteinů na membrány (kap. 3.2.4.2), k jejich stanovení byly použity lyzáty buněk RC-4B/C, buněčné membrány z potkaních hypotalamů a membrány buněk CHO-K1 s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem (pro stanovení receptoru NPFF₂). Protože se liší molekulové hmotnosti lidského a potkaního receptoru NPFF₂, resp. NPFF, nenacházejí se jejich proužky na stejném místě. Molekulová hmotnost lidského a potkaního receptoru GPR10 se příliš neliší [56]. Molekulové hmotnosti jednotlivých receptorů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2). Na obrázcích (Obr. 8, Obr. 9) jsou zobrazeny ukázky detekce receptorů.

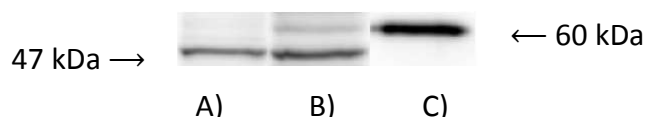
Tab. 2 Hmotnosti receptorů GPR10 a NPFF₂, zjištěné v online proteinové databázi [56]

receptor/typ receptoru	GPR10	NPFF ₂
lidský	41121 Da	60270 Da
potkaní	41161 Da	47711 Da



Obr. 8 Detekce receptoru GPR10 pro PrRP na A) hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, B) membránách z potkaních hypotalamů.

Receptor byl detekován pomocí protilátky proti myším receptoru GPR10.



Obr. 9 Detekce receptoru NPFF₂ na A) hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, B) membránách z potkaních hypotalamů a C) membránách s lidským NPFF₂ receptorem.

Receptor byl detekován pomocí protilátky proti lidskému NPFF₂ receptoru.

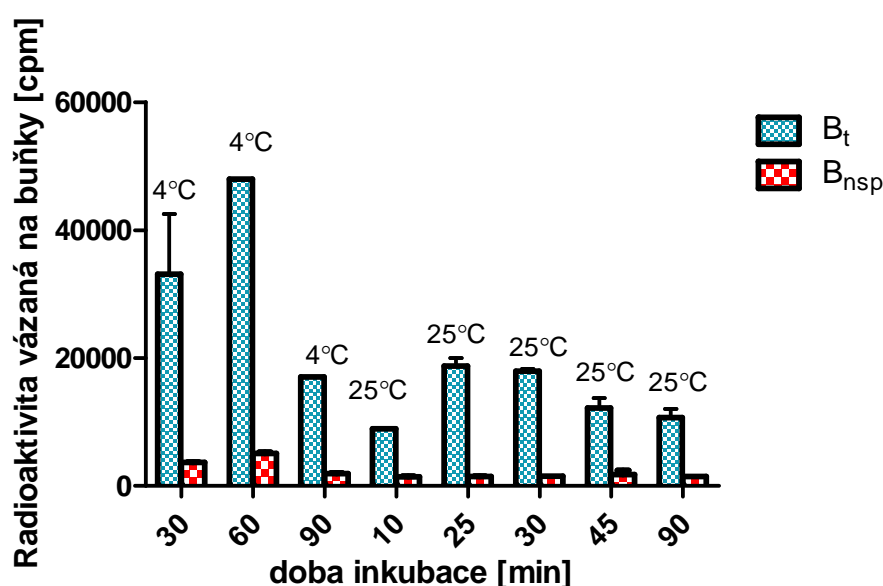
4.1.5 Vazebné experimenty

4.1.5.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů

Optimální podmínky pro vazebné testy byly zjišťovány pomocí závislosti totální (B_t) a nespecifické (B_{nsp}) vazby na buňkách RC-4B/C. Při optimálních podmínkách kompetitivní vazby by B_t vázaná na buňky měla tvořit maximálně 10% radioaktivity v roztoku a B_{nsp} by měla být maximálně 15% z B_t [53]. Mělo by být dosaženo rovnováhy, tj. B_t a B_{nsp} se v určitém časovém rozmezí nemění.

4.1.5.1.1 Závislost vazby Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C na teplotě a době inkubace

Z těchto pokusů při různé teplotě (4°C, 25°C) a různé době inkubace (30, 60 a 90 minut při 4°C, 10, 25, 30, 45 a 90 minut při 25°C) ve vazebném pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa) bylo zjištěno, že optimální teplota inkubace je 25°C a optimální doba inkubace byla 25 minut. Závislost specifické a nespecifické vazby na době a teplotě inkubace je zobrazena na obrázku (Obr. 10), hodnoty B_t a poměru B_{nsp}/B_t jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3, strana 29).



Obr. 10 Vazba Tyr¹NPFF na buňky RC-4B/C při různých teplotách a dobách inkubace

B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M 125 I-Tyr¹NPFF, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M Tyr¹NPFF a 10^{-10} M 125 I-Tyr¹NPFF. Inkubace probíhala při různých teplotách a dobách inkubace ve vazebném pufru 20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa.

Tab. 3 Poměr $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ při různých teplotách a dobách inkubace. B_{t} představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M ^{125}I -Tyr¹NPFF, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M Tyr¹NPFF a 10^{-10} M ^{125}I -Tyr¹NPFF. Inkubace probíhala při různých teplotách a dobách inkubace ve vazebném pufru 20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa.

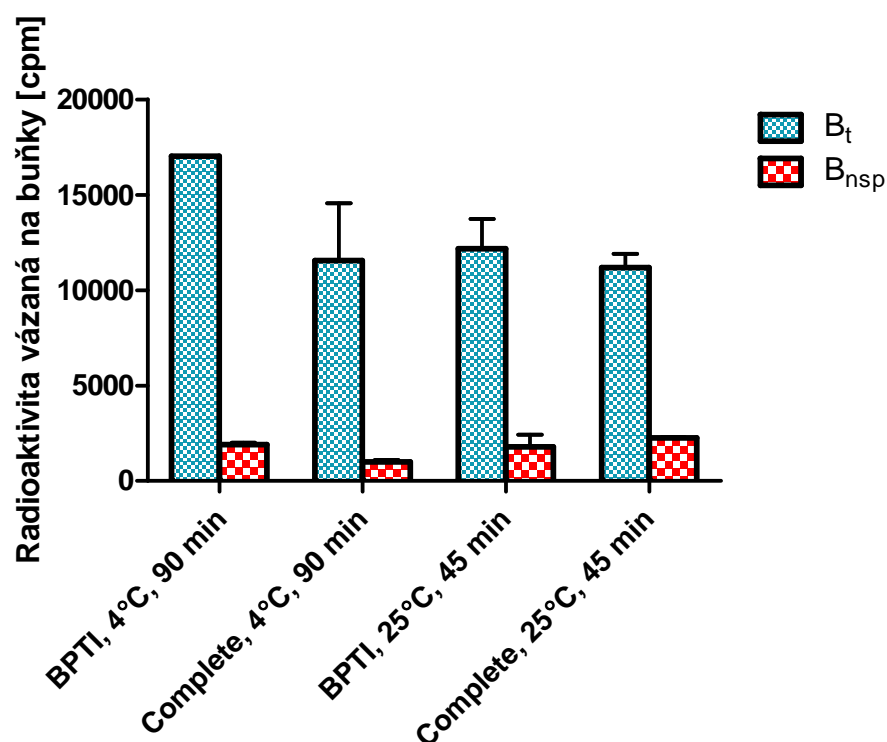
Teplota [°C]	Doba inkubace [min]	B_{t} [cpm]	$B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ [%]
4	30	33100	11,1
4	60	48000	10,6
4	90	17000	11,2
25	10	8900	15,8
25	25	18700	7,8
25	30	17900	8,6
25	45	12200	14,7
25	90	10700	13,9

4.1.5.1.2 Závislost vazby Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C na použitém inhibitoru proteas

Vazebné testy byly provedeny za přítomnosti BPTI, nebo směsi inhibitorů Complete. Jejich účinky byly sledovány při inkubaci 90 minut při 4°C a inkubaci 45 minut při 25°C. Zároveň byl vyměněn vazebný pufr 20 mM HEPES pH 7,4 za 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa).

Při inkubaci při 4°C bylo dosaženo nižšího podílu B_{nsp} , avšak jak bylo prokázáno v předchozí kapitole, výhodnější teplota inkubace pro vazbu Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C je 25°C, proto se jako účinnější inhibitor projevil BPTI, u něhož byl podíl B_{nsp} nižší.

Závislost specifické a nespecifické vazby na použitém inhibitoru při daných inkubacích je zobrazena na obrázku (Obr. 11, strana 30), hodnoty B_{t} a poměru $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4, strana 31).



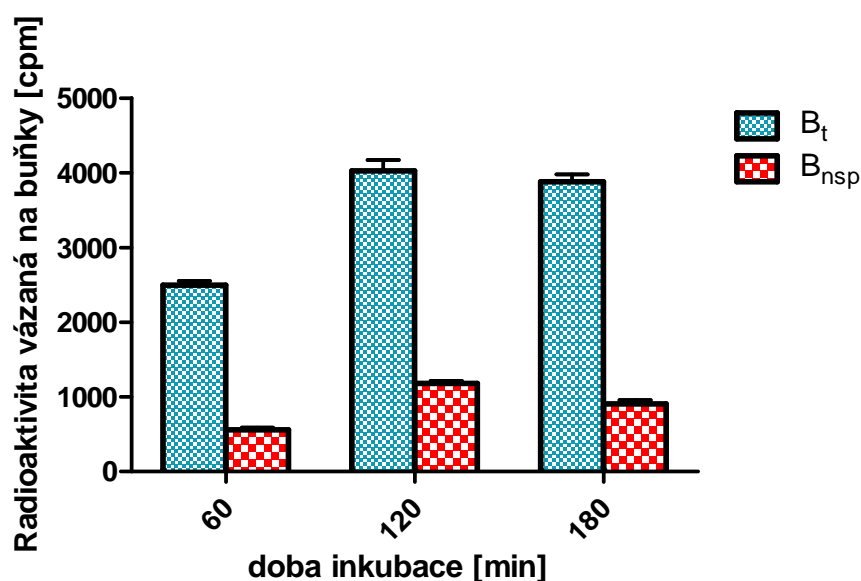
Obr. 11 Vazba Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C v závislosti na použitém inhibitoru proteas
 B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M 125 I-Tyr¹NPFF, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M Tyr¹NPFF a 10^{-10} M 125 I-Tyr¹NPFF. Inkubace probíhala při 4°C po dobu 90 minut, nebo při 25°C po dobu 45 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa a za použití buď BPTI, nebo směsi inhibitorů proteas Complete.

Tab. 4 Poměr $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ za použití různých inhibitorů proteas. Inkubace probíhala při 4°C po dobu 90 minut, nebo při 25°C po dobu 45 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa a za použití buď BPTI, nebo směsi inhibitorů proteas Complete. B_{t} představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M $^{125}\text{I-Tyr}^1\text{NPFF}$, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M Tyr^1NPFF a 10^{-10} M $^{125}\text{I-Tyr}^1\text{NPFF}$.

Inhibitor	Podmínky inkubace	B_{t} [cpm]	$B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ [%]
BPTI	4°C, 90 minut	17000	11,2
	25°C, 45 minut	12200	14,7
Complete	4°C, 90 minut	11600	8,8
	25°C, 45 minut	11200	20,2

4.1.5.1.3 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na době inkubace

Byly provedeny vazebné testy při různé době inkubace (60, 120 a 180 minut) ve vazebném pufru (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa a 1 mg/ml BPTI). Při inkubaci 180 minut se již dále nezvyšovala totální vazba, proto byla jako optimální určena doba inkubace 120 minut. Závislost B_{t} a B_{nsp} na době inkubace je znázorněna na obrázku (Obr. 12, strana 32), hodnoty B_{t} a poměru $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5, strana 32).



Obr. 12 Vazba 1DMe k buňkám RC-4B/C v závislosti na různých dobách inkubace

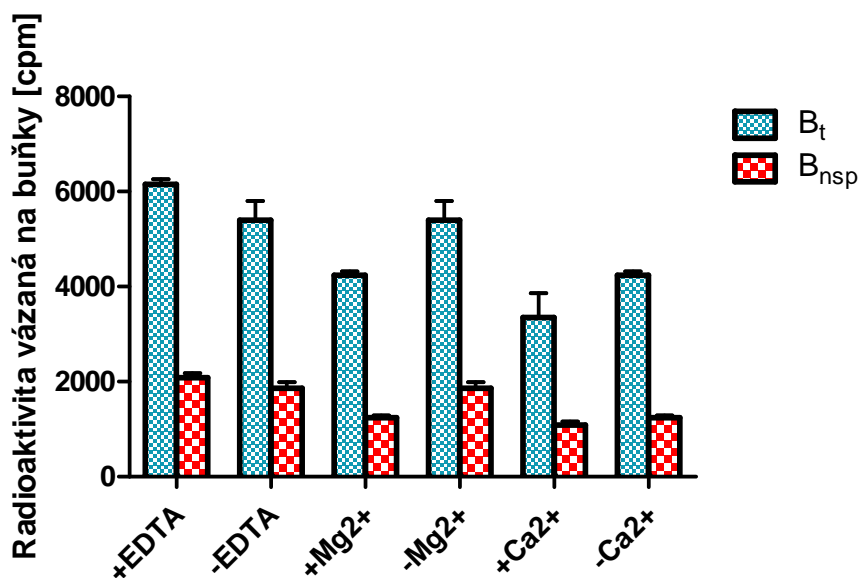
B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M 125 I-1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M 1DMe a 10^{-10} M 125 I-1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 60, 120 nebo 180 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa a 1 mg/ml BPTI.

Tab. 5 Poměr B_{nsp}/B_t při různých dobách inkubace. B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M 125 I-1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M 1DMe a 10^{-10} M 125 I-1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 60, 120 nebo 180 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa a 1 mg/ml BPTI.

Doba inkubace [min]	B_t [cpm]	B_{nsp}/B_t [%]
60	2500	22,5
120	4000	29,3
180	3900	23,3

4.1.5.1.4 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na složení vazebného pufru

Byl zkoumán vliv přidavku 2 mM EDTA, 5 mM Mg^{2+} ($MgCl_2$) a 2 mM Ca^{2+} ($CaCl_2$) do vazebného pufru (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa). Inkubace probíhala 120 minut při 25°C. Bylo zjištěno, že přidání EDTA do vazebného pufru snížilo B_{nsp} , přidání Mg^{2+} také B_{nsp} snížilo. Naopak přidání Ca^{2+} B_{nsp} zvýšilo, oba ionty však změnily podmínky vazby nevýrazně. Proto bylo optimální složení vazebného pufru s přidavkem 2 mM EDTA a za nepřítomnosti iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} . Závislost B_t a B_{nsp} na složení vazebného pufru je znázorněna na obrázku (Obr. 13), hodnoty B_t a poměru B_{nsp}/B_t jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6, strana 34).



Obr. 13 Graf závislosti B_t a B_{nsp} na složení vazebného pufru

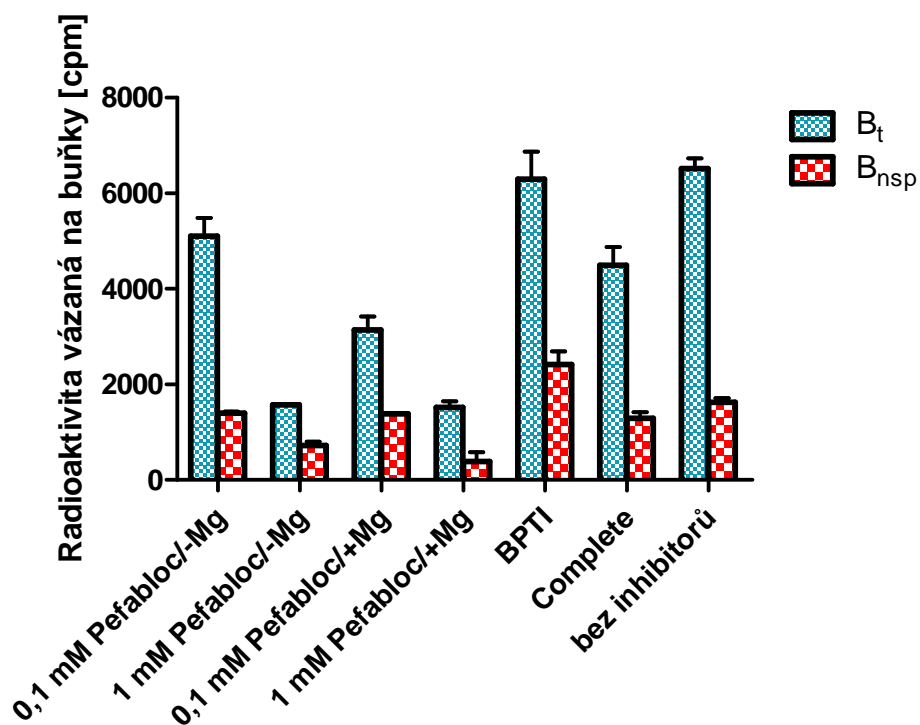
B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M ^{125}I -1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M 1DMe a 10^{-10} M ^{125}I -1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidáním 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa.

Tab. 6 Poměr $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ při různém složení vazebného pufru. B_{t} představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M ^{125}I -1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M 1DMe a 10^{-10} M ^{125}I -1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa.

složení vazebného pufru	B_{t} [cpm]	$B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ [%]
+EDTA	2100	33,8
-EDTA	1800	34,5
+Mg ²⁺	4200	29,4
-Mg ²⁺	5400	34,5
+Ca ²⁺	3300	32,3
-Ca ²⁺	4200	29,4

4.1.5.1.5 Závislost vazby 1DMe k buňkám RC-4B/C na použitém inhibitoru proteas

Při optimalizaci použití inhibitorů proteas byl vyzkoušen 0,1 mg/ml BPTI a dále směsi inhibitorů Complete a Pefabloc. Vliv inhibitoru Pefabloc byl zjišťován při použití v koncentraci 0,1 mM a 1 M a dále v kombinaci s působením iontů Mg²⁺ (5 mM, MgCl₂). Inkubace probíhala ve vazebném pufru (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa) při 25°C po dobu 120 minut. Jako optimální byly určeny podmínky bez použití inhibitoru proteas - v tomto případě byla nejvyšší totální vazba a zároveň nejnižší poměr $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$. Závislost totální a nespecifické vazby je zobrazena na obrázku (Obr. 14, strana 35). Hodnoty B_{t} a poměru $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7, strana 36).



Obr. 14 Graf závislosti B_t a B_{nsp} na použitém inhibitoru proteas

B_t představuje celkovou vazbu za přítomnosti $10^{-10} M$ ^{125}I -1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti $10^{-5} M$ 1DMe a $10^{-10} M$ ^{125}I -1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidáním 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa. Pefabloc byl vyzkoušen také v kombinaci s Mg^{2+} (5mM, $MgCl_2$).

Tab. 7 Poměr $B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ při použití různých inhibitorů proteas. B_{t} představuje celkovou vazbu za přítomnosti 10^{-10} M ^{125}I -1DMe, B_{nsp} je nespecifická vazba za přítomnosti 10^{-5} M 1DMe a 10^{-10} M ^{125}I -1DMe. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl s přidaným 1 mg/ml BSA a 2 g/l glukosa.

Inhibitor	B_{t} [cpm]	$B_{\text{nsp}}/B_{\text{t}}$ [%]
0,1 mM Pefabloc/-Mg	5100	27,3
1 mM Pefabloc/-Mg	1600	46,1
0,1 mM Pefabloc/+Mg	3100	44,0
1 mM Pefabloc/+Mg	1500	25,8
BPTI	6300	38,2
Complete	4500	28,8
bez inhibitorů	6500	25,1

4.1.5.1.6 Optimální vazebné podmínky pro Tyr¹NPFF a 1DMe

Z předchozích experimentů vyplynulo, že optimální podmínky pro vazebné experimenty s Tyr¹NPFF na buňkách RC-4B/C jsou použití pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI při inkubaci po dobu 25 minut při 25°C.

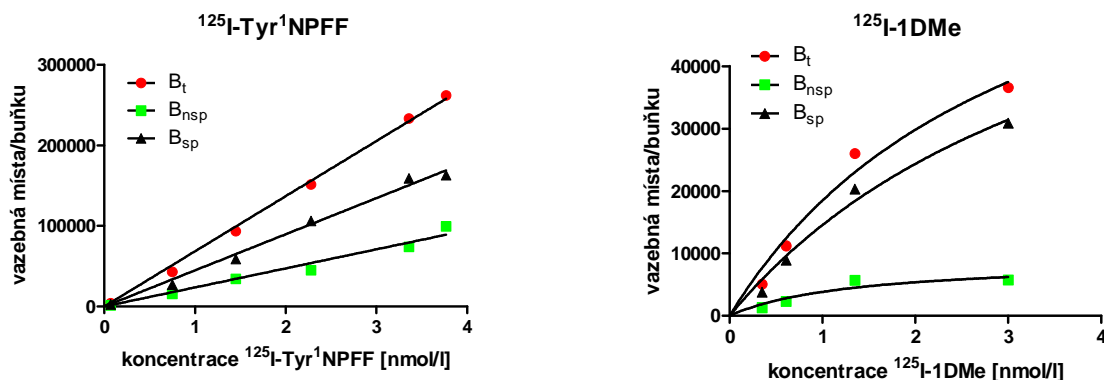
Pro vazbu 1DMe k buňkám RC-4B/C je optimální inkubace při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 2 mM EDTA bez použití inhibitorů proteas.

Protože v průběhu vazebných experimentů docházelo ke štěpení peptidu Tyr¹NPFF v důsledku působení proteas produkovaných buněčnou linií, byl pro další vazebné experimenty používán stabilnější analog NPFF 1DMe. Stabilita obou analogů byla ověřena na LC/MS na oddělení Hmotové spektrometrie, ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha.

4.1.5.2 Saturační vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C

U všech experimentů nespecifická vazba rostla se zvyšující se koncentrací radioligandu a nikdy by neměla překročit 50 % celkové vazby.

Ze saturačních vazebných experimentů na buňkách RC-4B/C s $^{125}\text{I-Tyr}^1\text{NPFF}$ bylo zjištěno B_{\max} 387000 ± 114000 vazebných míst na buňku a K_d $6,22 \pm 1,03$ nM. Pro saturační vazebné testy s $^{125}\text{I-1DMe}$ byla hodnota B_{\max} 68900 ± 5900 vazebných míst na buňku a K_d $4,23 \pm 0,12$ nM. Reprezentativní saturační vazebné křivky jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 15).

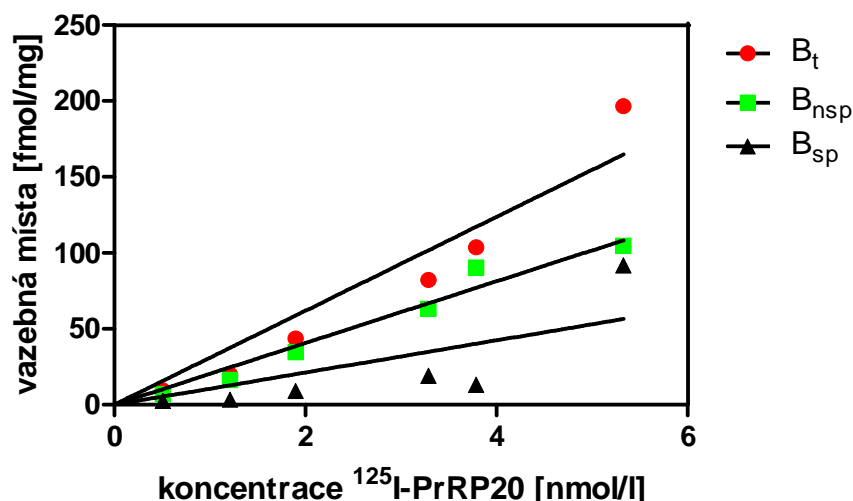


Obr. 15 Reprezentativní křivky saturačních vazebných experimentů s Tyr¹NPFF a 1DMe na buňkách RC-4B/C

Saturační vazebné experimenty s Tyr¹NPFF na buňkách RC-4B/C probíhaly ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI při inkubaci po dobu 30 minut při 25°C. Saturační vazebné experimenty s 1DMe na buňkách RC-4B/C probíhaly ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 2 mM EDTA při 25°C po dobu 120 minut. B_t je celková vazba radioligandu v rozmezí finálních koncentrací 0,5 - 5 nM, B_{nsp} je vazba příslušné koncentrace radioligandu a neznačeného peptidu o finální koncentraci 10⁻⁵ M, B_{sp} byla spočítána jako rozdíl B_t a B_{nsp}.

4.1.5.3 Saturační vazebné experimenty na membránách z potkaních hypotalamů

Saturační vazebné experimenty na membránách z potkaních hypotalamů s $^{125}\text{I-PrRP31}$ byly provedeny podle postupu popsaneho v kapitole 3.2.3.3. Nespecifická vazba nepřekročila 70 % celkové vazby. Jak lze vidět z obrázku (Obr. 14), naměřené hodnoty nebylo možné proložit nelineární regresí, proto ani nebylo možné určit hodnoty B_{\max} a K_d . Saturační vazebná křivka $^{125}\text{I-PrRP31}$ je znázorněna na obrázku (Obr. 16, strana 38).

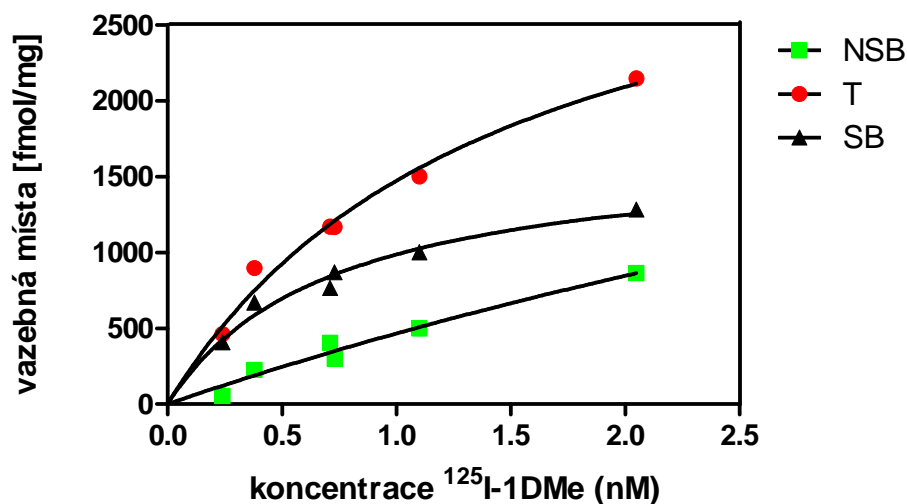


Obr. 16 Reprezentativní křivka saturačních vazebných experimentů s $^{125}\text{I-PrRP31}$ na membránách z potkaních hypothalamů

B_t je celková vazba $^{125}\text{I-PrRP31}$ v rozmezí finálních koncentrací 0,5 - 5 nM, B_{nsp} je vazba příslušné koncentrace $^{125}\text{I-PrRP31}$ a neznačeného PrRP20 ve finální koncentraci 10^{-5} M, B_{sp} byla spočítána jako rozdíl B_t a B_{nsp} . Inkubace probíhala 60 min při 25°C ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mg/ml BSA, 0,2 mg/ml Pefabloc, 0,1 mg/ml BPTI, 2 mM EDTA), hmotnost membrán byla 40 μg /zkumavku.

4.1.5.4 Saturační vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF₂

Saturační vazebné experimenty na buněčných membránách s transfektovaným lidským receptorem NPFF₂ s $^{125}\text{I-1DMe}$ prokázaly B_{\max} 1780 ± 70 fmol/mg vazebných míst na buňku a K_d $0,72 \pm 0,12$ nM. Saturační vazebná křivka $^{125}\text{I-1DMe}$ je znázorněna na obrázku (Obr. 17, strana 39).

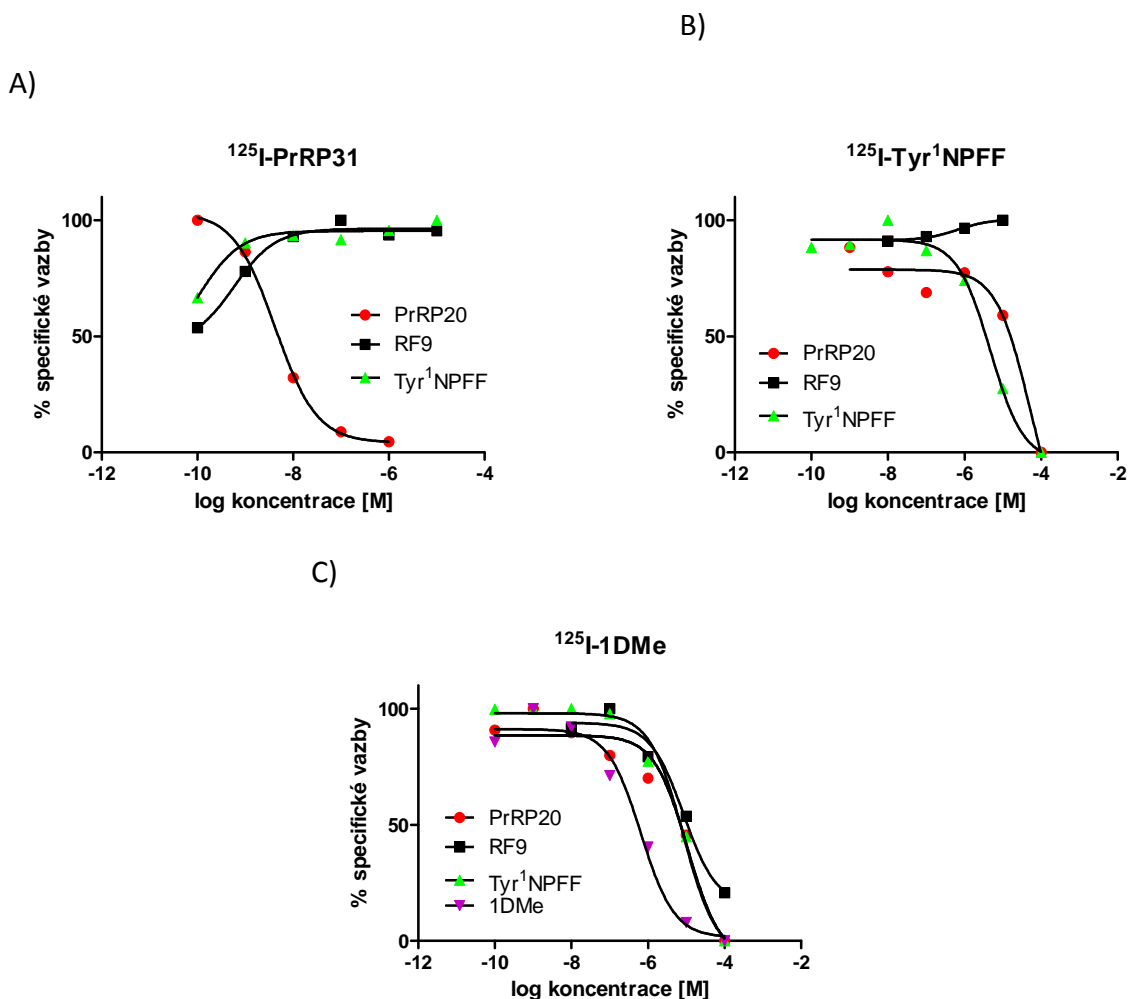


Obr. 17 Reprezentativní křivka saturačních vazebných experimentů s ^{125}I -1DMe na buněčných membránách (z buněk CHO-K1) s transfektovaným lidským receptorem NPFF₂

B_t je celková vazba ^{125}I -1DMe v rozmezí finálních koncentrací 0,5 - 5 nM, B_{nsp} je vazba příslušné koncentrace ^{125}I -1DMe a nezačteného 1DMe ve finální koncentraci 10^{-5} M, B_{sp} byla spočítána jako rozdíl B_t a B_{nsp} . Inkubace probíhala 120 min při 25°C ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA. Membrány byly použity v množství 3 μg /zkumavku.

4.1.5.5 Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C

Pokusy proběhly za zjištěných optimálních podmínek (kapitola 4.1.4.1.6). Pro výpočet inhibiční konstanty nezačtené látky K_i bylo do rovnice Chenga a Prussofa [54] za K_d dosazena hodnota 6,22 nM pro Tyr¹NPFF, 4,23 nM pro 1DMe a 4,21 nM pro PrRP20. Hodnota K_d pro PrRP20 byla zjištěna ze saturačních vazebných experimentů z práce [32]. Koncentrace radioligandu byla 0,1 nM. Hodnoty K_i s příslušnými hodnotami S.E.M. jsou uvedeny v tabulce shrnující *in vitro* experimenty (Tab. 8, strana 43). Na obrázku (Obr. 18, strana 40) jsou grafy s typickými vazebnými křivkami jednotlivých peptidů.

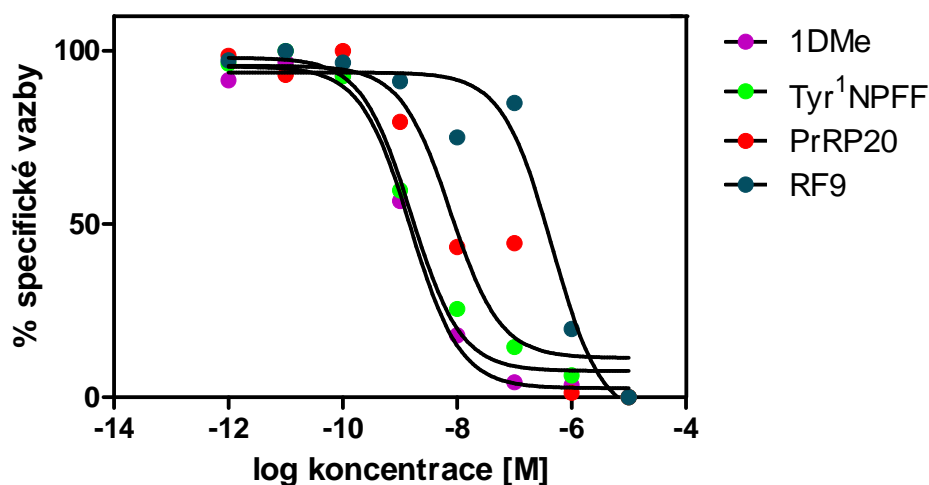


Obr. 18 Grafy zobrazující reprezentativní vazebné křivky PrRP20 a analogů NPFF z kompetitivních vazebných pokusů na buňkách RC-4B/C

Inkubace ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 2 mM EDTA, 0,1 mg/ml BPTI pro ^{125}I -PrRP31 a ^{125}I -Tyr¹NPFF, bez inhibitorů proteas a bez MgCl_2 pro ^{125}I -1DMe, s ^{125}I -Tyr¹NPFF 30 minut a s ^{125}I -1DMe 120 minut při 25°C. Pro testy s ^{125}I -PrRP31 probíhala inkubace ve vazebném pufru 20 mM HEPES, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI po dobu 60 minut. Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (tj. po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti neznačeného ligandu ve finální koncentraci 10^{-5} M). Reprezentativní křivky jsou alespoň ze tří pokusů v duplikátech.

4.1.5.6 Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF₂

Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským NPFF₂ receptorem byly provedeny za podmínek popsanych v kapitole 3.2.3.6. K výpočtu K_i byla za K_d dosazena hodnota zjištěná ze saturačních vazebných experimentů na membránách s lidským NPFF₂ receptorem, tj. 0,72 nM (kapitola 4.1.3.4). Koncentrace ¹²⁵I-1DMe byla 0,1 nM. V grafu na obrázku (Obr. 19) jsou zobrazeny typické vazebné křivky jednotlivých peptidů. Hodnoty inhibičních konstant K_i jednotlivých peptidů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8, strana 43), ve které jsou shrnuty všechny *in vitro* pokusy.



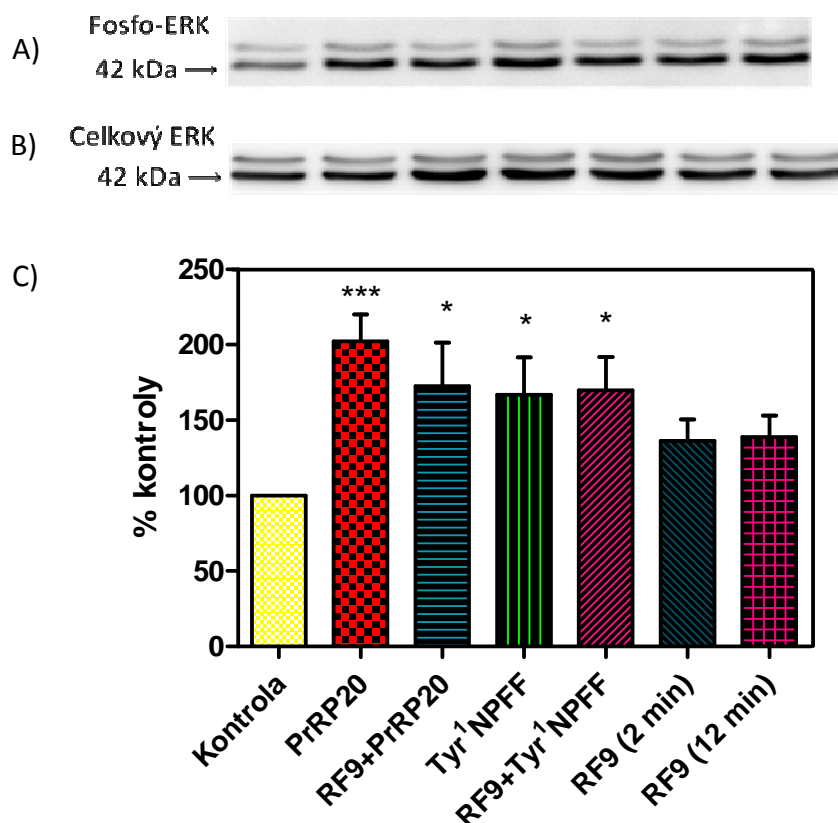
Obr. 19 Reprezentativní vazebné křivky 1DMe, Tyr¹NPFF, PrRP20 a RF9 získané kompetitivními vazebnými testy na membránách buněk CHO-K1 s lidským receptorem NPFF₂

Inkubace ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA po dobu 120 minut při 25°C. Buněčné membrány byly použity v množství 3 µg/zkumavku. Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti neznačeného ligandu ve finální koncentraci 10⁻⁵ M). Reprezentativní křivky jsou ze tří pokusů v duplikátech.

4.1.6 Fosforylace MAPK/ERK1/2 po působení PrRP20 a analogů NPFF u hypofyzární buněčné linie RC-4B/C

Hypofyzární buněčná linie RC-4B/C byla pěstována na 6-jamkových destičkách za podmínek popsanych v kapitole 3.2.1. Pozitivní kontrolou byl PrRP20, u kterého bylo

spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 prokázáno [32]. Výsledky spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 po působení PrRP20 a analogů NPFF jsou shrnuty v tabulce (Tab. 8, strana 43). Na obrázku (Obr. 20) je zobrazen graf znázorňující spouštění této signální dráhy.



Obr. 20 Reprezentativní membrány pro kvantifikaci A) fosforylovaného ERK, B) celkového ERK v buňkách RC-4B/C metodou přenosu proteinů na membrány, C) graf znázorňující spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 působením PrRP20 a analogů NPFF oproti kontrole.

Buňky RC-4B/C byly inkubovány s peptidy po dobu 2 minut, u RF9 byla provedena i inkubace po dobu 12 minut. V případě kombinace RF9 s PrRP20 nebo Tyr¹NPFF byl RF9 inkubován 10 minut a poté byl přidán další peptid, následná inkubace trvala opět 2 minuty. Finální koncentrace peptidů v jamce byla 10^{-4} až 10^{-6} M. Na buňky, které byly použity jako kontrola, nebyl aplikován žádný peptid. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37°C. Sběr vzorků a přenos proteinů na membrány proběhly podle postupů uvedených v kapitolách 3.2.4.1 a 3.2.4.2. Data jsou průměr \pm S.E.M.. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

4.1.7 Shrnutí výsledků *in vitro* experimentů

Výsledky všech provedených *in vitro* experimentů popsanych v kapitolách výše jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 8).

Tab. 8 Přehled výsledků získaných působením PrRP20, analogů NPFF a jejich kombinací na hypofyzární buněčnou linii RC-4B/C a buněčné membrány s receptorem NPFF₂

Bez účinku znamená, že peptid za daných podmínek nevytěsnil vazbu radioaktivně značeného ligandu až do koncentrace 10^{-5} M, popř. neměl vliv na spouštění buněčné signalizace MAPK/ERK1/2.

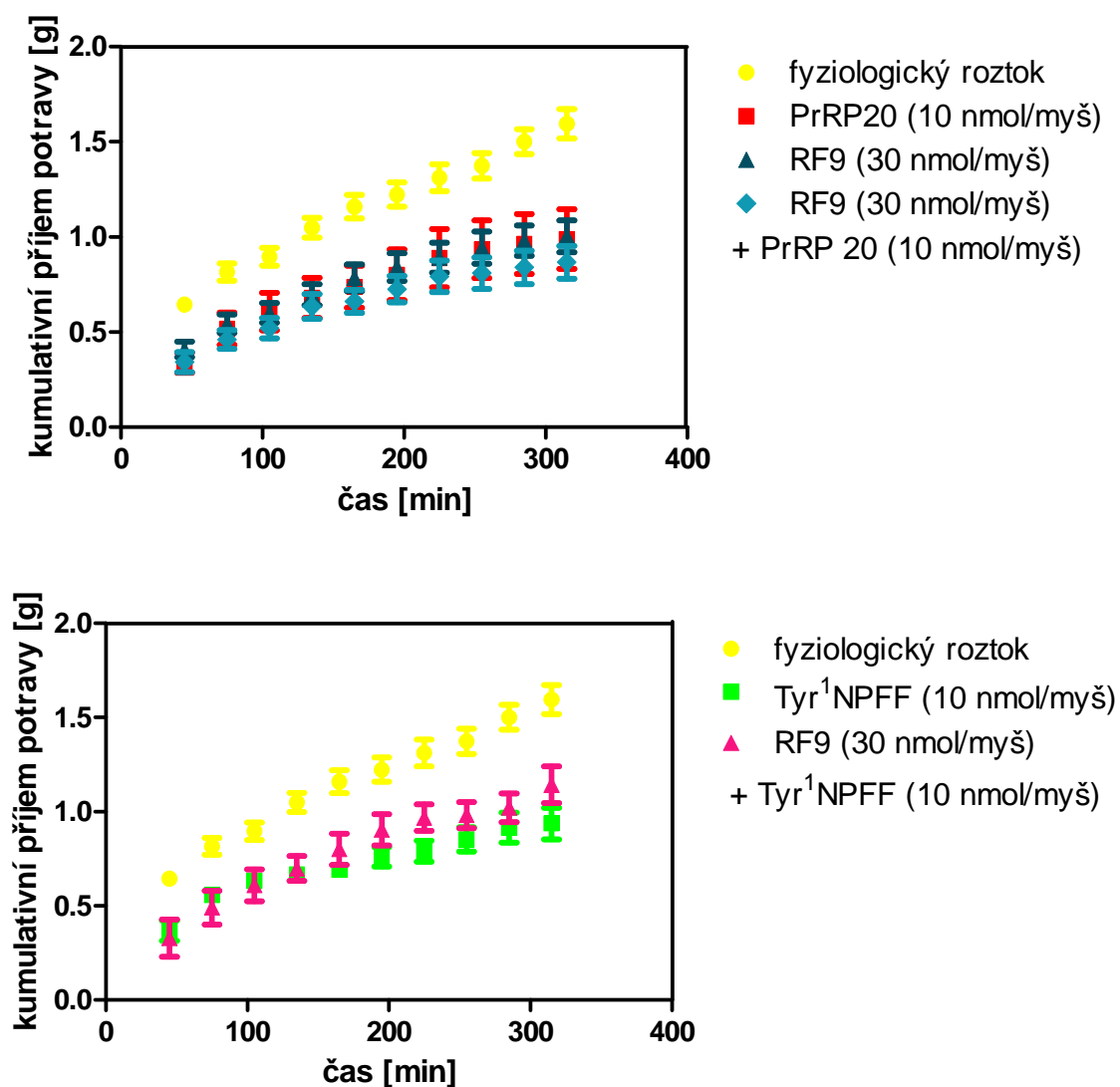
Analog	Saturační vazebné experimenty			
	na buňkách RC-4B/C		na membránách s lidským receptorem NPFF ₂	
	K_d [nM]	B_{max} [vazebných míst/buňku]	K_d [nM]	B_{max} [fmol/mg]
Tyr ¹ NPFF	6,22 ± 1,03	387000 ± 114000	-	-
1DMe	4,23 ± 0,12	68900 ± 5900	0,72 ± 0,12	1780 ± 70
Vytěsnění vazby ¹²⁵ I-analogu analogem	Kompetitivní vazebné experimenty			
	na buňkách RC-4B/C			na membránách s lidským receptorem NPFF ₂
	¹²⁵ I-PrRP31 K_i [nM]	¹²⁵ I-Tyr ¹ NPFF K_i [nM]	¹²⁵ I-1DMe K_i [nM]	¹²⁵ I-1DMe K_i [nM]
PrRP20	2,38 ± 0,19	13600 ± 11800	6970 ± 2740	2,18 ± 0,99
Tyr ¹ NPFF	bez účinku	6180 ± 1510	5980 ± 3020	0,869 ± 0,387
1DMe	-	-	878 ± 129	0,912 ± 0,252
RF9	bez účinku	bez účinku	13900 ± 7000	603 ± 417
Analog		Spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2		
PrRP20		agonista		
Tyr ¹ NPFF		agonista		
RF9		bez účinku		

4.2 POKUSY *IN VIVO*

4.2.1 Ovlivnění příjmu potravy po ICV podání PrRP20 a analogů NPFF

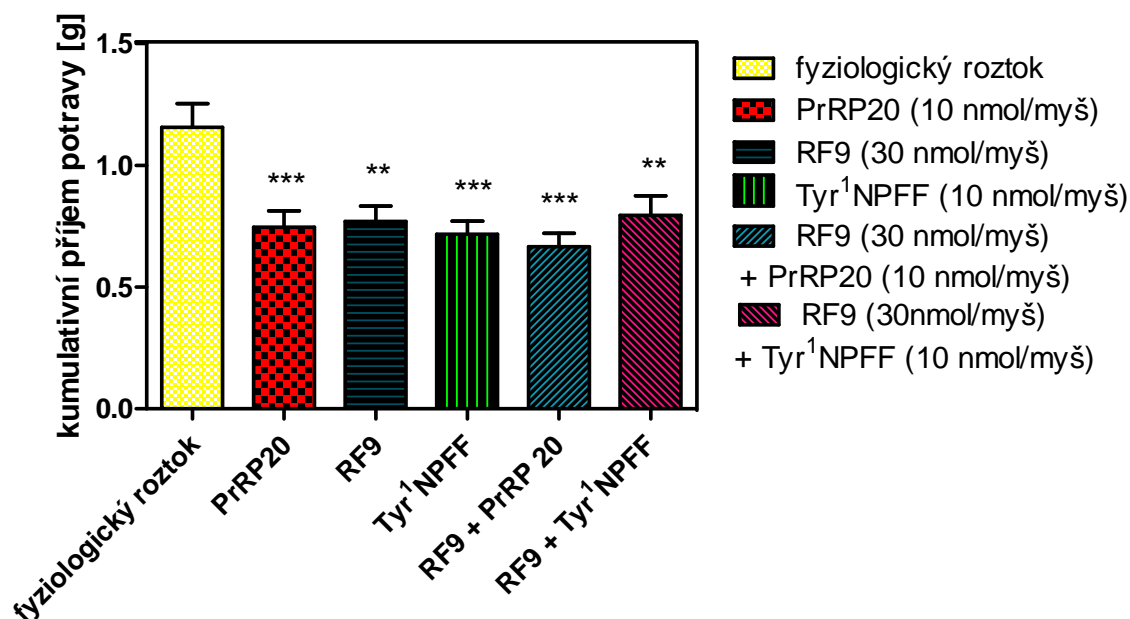
Změny v příjmu potravy byly sledovány u samců kmene C57Bl/6, kterým byly aplikovány jednotlivé peptidy, či jejich kombinace (kapitola 3.3.4) kanylou zavedenou do 3. mozkové komory. Myším samcům, kteří představovali kontrolní skupinu, byl místo peptidu podán fyziologický roztok, v každé skupině bylo minimálně 6 myší a každý analog, nebo jejich kombinace, byl testován nejméně dvakrát. Kumulativní příjem potravy byl sledován po dobu 5 hodin od podání příslušné látky.

Po podání PrRP20 a Tyr¹NPFF došlo ke snížení příjmu potravy, při podání těchto látek v kombinaci s RF9 nedošlo ke změně oproti podání samotných peptidů. Avšak aplikace samotného RF9 příjem potravy také snížila. Všechny výsledky byly signifikantní ve srovnání s účinky fyziologického roztoku. Na obrázcích (Obr. 21, strana 45; Obr. 22, strana 46) jsou grafy kumulativních příjmů potravy myšího samce po podání peptidů.



Obr. 21 Grafy kumulativního příjmu potravy myšího samce kmene C57Bl/6 po podání PrRP20 a analogů NPFF v závislosti na čase

Peptidy byly injektovány do 3. mozkové komory v dávce 10 nmol/myš (PrRP20, Tyr¹NPFF) nebo 30 nmol/myš (RF9) v 5 μ l/myš. Data byla vyhodnocena metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem ($n = 6$). Data jsou průměr \pm S.E.M. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

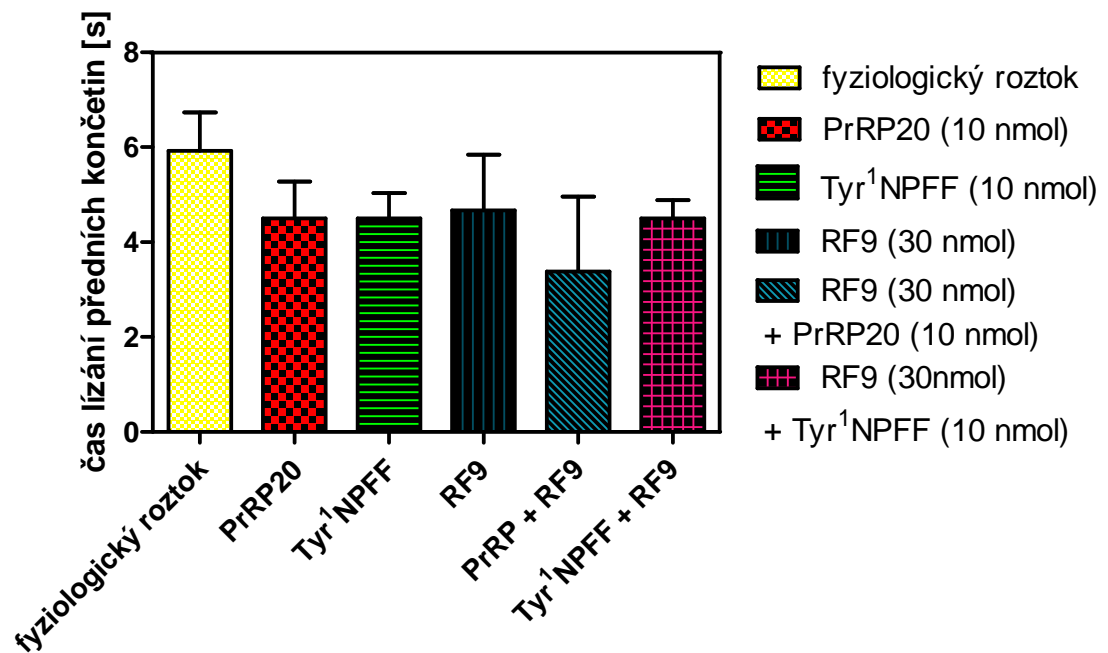


Obr. 22 Graf kumulativního příjmu potravy myšího samce kmene C57Bl/6 po podání PrRP20 a analogů NPFF v závislosti na čase

Peptidy byly injektovány do 3. mozkové komory v dávce 10 nmol/myš (PrRP20, Tyr¹NPFF) nebo 30 nmol/myš (RF9) v 5 μ l/myš. Data byla vyhodnocena metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem ($n = 6$). Data jsou průměr \pm S.E.M. Signifikance je * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$.

4.2.2 Analgetické účinky PrRP20 a analogů NPFF

Analgetické účinky peptidů a jejich kombinací (kapitola 3.3.5) byly měřeny 15 minut po ICV podání látek pomocí testu na horké plotně (hot plate) při 53°C. Měřenou reakcí myši byl čas, po kterém si myš začala lízat přední končetiny v reakci na bolest indukovanou horkou plotnou (Obr. 23).



Obr. 23 Analgetický test na horké plotně po ICV podání fyziologického roztoku, PrRP20, nebo analogů NPFF

Peptidy byly injektovány do 3. mozkové komory v dávce 10 nmol/myš (PrRP20, Tyr¹NPFF) nebo 30 nmol/myš (RF9) v 5 µl/myš, byl měřen čas, kdy si myš začala lízat přední končetiny v reakci na bolest vyvolanou horkou plotnou (53°C). Data byla vyhodnocena medou jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (n = 6). Všechny změny vzhledem ke kontrole byly nesignifikantní.

5. DISKUZE

K regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy (vztah energetického příjmu a výdeje) přispívá mnoho složitých dějů ovlivňovaných řadou metabolických procesů. Těchto procesů se účastní jak látky přijímané v potravě, tak látky produkované v periférii (hlavně v gastrointestinálním traktu), ale i v CNS, a které spolu navzájem interagují. Tyto signály jsou zpracovány v hypothalamu, odkud jsou vysílány další signály do jiných částí CNS, které produkují anorexigenní či orexigenní faktory. Tyto procesy jsou velmi složité, neboť se jich účastní velké množství neuropřenašečů a hormonů, které mají většinou charakter peptidů. Peptidů účastnících se regulace příjmu potravy byla za posledních 15 let objeveno velké množství, avšak jejich funkce nejsou přesně známy [57].

Mezi tyto peptidy patří také PrRP, který byl původně považován za faktor způsobující uvolnění prolaktinu [8], to bylo ale brzy zpochybněno [20]. Dalším peptidem ovlivňujícím příjem potravy je NPFF, který je znám hlavně jako modulátor opioidního systému [42].

Tato práce se zabývala účinkem PrRP20 a analogů NPFF v *in vitro* pokusech na potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a buněčných membránách obsahujících receptory GPR10 a NPFF₂ a *in vivo* experimentech na myších samcích kmene C57Bl/6. Bylo zjišťováno, jestli analogy PrRP mohou působit na snížení příjmu potravy nejen přes svůj vlastní receptor (GPR10), ale i také přes receptor NPFF₂.

5.1 POKUSY *IN VITRO*

In vitro pokusy byly prováděny na potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, u které se přirozeně vyskytuje GPR10. Ten je zde zastoupen v počtu deseti tisíců vazebných míst na buňku [32].

Vazba PrRP20 a analogů NPFF k receptorům GPR10 a NPFF₂ byla charakterizována pomocí kompetitivních vazebných experimentů. Pomocí speciálních protilátek metodou přenosu proteinů na membrány bylo nejprve ověřeno, že buňky RC-4B/C obsahují oba typy receptorů: GPR10 i NPFF₂. Oba typy receptorů byly přítomny i v potkaních hypothalamických membránách. Dále byly detekovány membrány z buněk

s transfektovaným lidským receptorem NPFF₂. Vazebné experimenty byly prováděny za optimálních podmínek, kterými jsou pro PrRP20 90 min inkubace při 25°C ve vazebném pufru 20 mM HEPES s pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa a s přidáním BPTI (0,1 mg/ml), jak již bylo v naší skupině publikováno [32].

Pro zjištění vazby Tyr¹NPFF k buňkám RC-4B/C byly nejprve optimalizovány podmínky experimentu (závislost na teplotě, času a použití inhibitorů proteas). Pro vazbu Tyr¹NPFF byly jako nejlepší podmínky nalezeny inkubace 25 minut při 25°C ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI.

Pro vazbu stabilního analogu 1DMe k buňkám RC-4B/C byly nalezeny optimální podmínky inkubace při 25°C po dobu 120 minut ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 118 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 2 mM EDTA bez použití inhibitorů proteas.

Saturačními vazebnými experimenty na buňkách RC-4B/C bylo dokázáno, že PrRP i 1DMe se k těmto buňkám vážou s vysokou afinitou a nízkou nespecifickou vazbou, podobně jako tomu bylo v naší předchozí studii [32] nebo pro 1DMe ve studii [44], kde byla studována vazba 1DMe k membránám z potkaní míchy. Tyr¹NPFF se k těmto buňkám váže také, avšak s vysokou nespecifickou vazbou, která je důsledkem toho, že dochází k proteolytickému štěpení tohoto peptidu, jak bylo dokázáno pomocí LC/MS. K membránám z potkaních hypotalamů, izolovaných a uchovaných dle studie [30], se váže jak PrRP20, tak i Tyr¹NPFF, ovšem opět s vysokou nespecifickou vazbou, jelikož opět patrně dochází ke štěpení obou peptidů proteasami. V této studii bylo také prokázáno, že 1DMe se váže k buněčným membránám s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem, podobně jako ve studii [7], kde byly také použity membrány z buněk s transfektovaným receptorem NPFF₂.

Kompetitivní vazebné experimenty potvrdily vazbu PrRP20 k buňkám RC-4B/C, avšak ukázalo se, že 1DMe se váže s nízkou afinitou. Ačkoliv zůstala stabilita 1DMe zachována, což bylo potvrzeno pomocí LC/MS, systém nebyl vhodný pro testování kompetitivní vazby. Dále bylo potvrzeno, že se PrRP20 váže k buňkám RC-4B/C s vysokou afinitou, tj. s nízkou hodnotou K_i , v řádu 10^{-9} M, což je shodné s již publikovanými výsledky [32]. Naopak žádný z analogů NPFF se ke stejným receptorům jako PrRP20 nevázal. Z toho lze usoudit, že PrRP20 se v buňkách RC-4B/C vázal ke svému receptoru GPR10. Vazba 1DMe, Tyr¹NPFF

a PrRP k NPFF₂ receptoru také odpovídala publikovaným výsledkům [7]. Tyto výsledky byly získány z kompetitivních vazebných experimentů na buněčných membránách s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem, avšak nebyly potvrzeny testy na buňkách RC-4B/C, jelikož Tyr¹NPFF byl štěpen proteasami produkovanými buňkami a 1DMe vykazoval špatnou afinitu k této buněčné linii.

Nebyla však potvrzena afinita RF9 k receptoru NPFF₂ a to ani na buněčných membránách s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem (K_i 6×10^{-7} M), což ukazuje, že RF9 není účinným inhibítozem tohoto receptoru. RF9 je v literatuře prezentován jako nový účinný a selektivní inhibitor receptoru NPFF₂ s vysokou afinitou [46] a *in vivo* aktivitou - schopností inhibovat biologické účinky NPFF [46, 48, 49, 51]. Díky nízké afinitě k receptoru zjištěné v této studii bylo pravděpodobné, že RF9 nebude vykazovat ani biologickou aktivitu *in vivo*.

Z funkčních testů bylo také testováno spouštění cytosolické signální dráhy MAPK/ERK1/2, která se účastní aktivace genu pro prolaktin [58]. Důkaz spouštění této signální dráhy byl proveden detekcí fosforylovaných proteinů pomocí protilátek metodou přenosu proteinů na PVDF membránu. Protože EGF spouští tuto signální dráhu, bylo buňkám RC-4B/C 17 hodin před sběrem vzorků vyměněno růstové médium za médium bez séra a bez EGF. Spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 bylo prokázáno u PrRP20 a Tyr¹NPFF. RF9 samostatně způsobil nesignifikantní zvýšení fosforylace, což by mohlo dokazovat fakt, že není inhibítozem receptoru NPFF₂, ale pouze jeho parciálním agonistou. V kombinaci s PrRP20 nebo Tyr¹NPFF neměl RF9 na fosforylaci MAPK/ERK1/2 vliv.

5.2 POKUSY *IN VIVO*

Výskyt PrRP v oblastech mozku účastnících se regulace energetické rovnováhy (PVN a DMN) a snížené množství mRNA pro PrRP při negativní energetické bilanci, která nastává např. při hladovění nebo při kojení, dalo základ pro uvažování o PrRP jako o anorexigenním faktoru [21]. Bylo potvrzeno, že PrRP po ICV podání snižuje příjem potravy, i když pravděpodobně pouze krátkodobě, avšak periferní podání PrRP nemá vliv ani na příjem potravy [32], ani na zvýšení hladiny PRL v krvi [20]. Z tohoto důvodu byly

účinky PrRP a analogů NPFF sledovány pouze po centrálním podání. K testům ovlivnění příjmu potravy a analgetických účinků PrRP a analogů NPFF byly využity myši samci kmene C57Bl/6, kterým byla pro umožnění ICV podání zavedena kanyla do třetí mozkové komory [55].

Peptidy byly podány v objemu 5 μ l/myš v dávce 10 nmol/myš pro PrRP20 a Tyr¹NPFF, RF9 byl podáván ve stejném objemu, ale v dávce 30 nmol/myš, podobně jako v jiných studiích [49, 51, 59]. Vliv na snížení příjmu potravy měl PrRP20 a Tyr¹NPFF. Překvapivým výsledkem bylo, že příjem potravy snížil i RF9 podaný jak samotný, tak v kombinaci s PrRP20 a Tyr¹NPFF, což by mohlo znamenat že příjem potravy ovlivňuje vazbou na jiný receptor než GPR10 a NPFF₂.

Výsledky analgetického testu na horké plotně nebyly signifikantní. Přesto bylo možné pozorovat mírný algesický (bolest zvyšující) účinek PrRP20 i Tyr¹NPFF. RF9 samotný nevykazoval žádnou algesickou nebo analgetickou aktivitu, avšak v kombinaci s PrRP20 působil algesicky, avšak také nesignifikantně.

Tato studie ukazuje poprvé účinek RF9 na příjem potravy po ICV podání myším jak samotného RF9, tak v kombinaci s PrRP nebo NPFF.

RF9 v testu příjmu potravy podle předpokladu (na základě nízké afinity k receptoru NPFF₂) neinhiboval účinek ani NPFF, ani PrRP. Překvapivé bylo zjištění, že samotný RF9 snižoval signifikantně příjem potravy po centrálním podání. Mechanismus tohoto účinku není znám, účinky RF9 budou předmětem dalších studií.

6. ZÁVĚR

1) *In vitro* experimenty na potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C bylo prokázáno, že je vhodná pro testy s PrRP20, buněčné membrány s transfektovaným lidským NPFF₂ receptorem jsou vhodné pro vazbu analogů NPFF, avšak membrány z potkaních hypotalamů se neukázaly jako vhodné pro testování vazby žádného z těchto peptidů, neboť zde docházelo k jejich degradaci a vysoké nespecifické vazbě. Vazebnými testy bylo zjištěno, že Tyr¹NPFF, 1DMe ani RF9 se nevážou na receptor GPR10 a že PrRP20 se váže na receptor NPFF₂ s afinitou 10x nižší než je vazba NPFF k NPFF₂ receptoru. Dále bylo zjištěno, že RF9 není účinným antagonistou NPFF₂, protože se k tomuto receptoru váže velice slabě (řádově 10⁻⁶ M) a není schopen inhibovat signalizaci do buněk RC-4B/C způsobenou Tyr¹NPFF nebo PrRP20. Účinky RF9 nejsou jasné a tyto výsledky nepotvrzují účinky publikované[46].

2) V *in vivo* experimentech bylo potvrzeno, že PrRP20 i Tyr¹NPFF snižují příjem potravy. Jelikož se PrRP20 váže i k NPFF₂ receptoru, je možné, že působí na příjem potravy i přes tento receptor, avšak vzhledem k lokalizaci receptoru NPFF₂ by byl místem účinku mozkový kmen a mícha a ne PVN. Jelikož se však RF9 neukázal být účinným antagonistou tohoto receptoru, nebylo možné tento fakt dokázat. Testem na horké plotně byly zjištěny algesické účinky PrRP20, které však nebyly signifikantní.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] K.A. Simpson, N.M. Martin, S.R. Bloom, Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications., *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53 (2009) 120-128.
- [2] P.G. Kopelman, Obesity as a medical problem., *Nature*, 404 (2000) 635-643.
- [3] A.D. Strader, S.C. Woods, Gastrointestinal hormones and food intake., *Gastroenterology*, 128 (2005) 175-191.
- [4] E. Dozio, M. Ruscica, M. Motta, P. Magni, Hypothalamic neuropeptide systems as targets for potential anti-obesity drugs., *Mini Rev Med Chem*, 7 (2007) 11-19.
- [5] G.J. Dockray, The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour., *Exp Physiol*, 89 (2004) 229-235.
- [6] D.A. Bechtold, S.M. Luckman, The role of RFamide peptides in feeding., *J Endocrinol*, 192 (2007) 3-15.
- [7] M. Engström, A. Brandt, S. Wurster, J.M. Savola, P. Panula, Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors., *J Pharmacol Exp Ther*, 305 (2003) 825-832.
- [8] S. Hinuma, Y. Habata, R. Fujii, Y. Kawamata, M. Hosoya, S. Fukusumi, C. Kitada, Y. Masuo, T. Asano, H. Matsumoto, M. Sekiguchi, T. Kurokawa, O. Nishimura, H. Onda, M. Fujino, A prolactin-releasing peptide in the brain., *Nature*, 393 (1998) 272-276.
- [9] S. Fukusumi, R. Fujii, S. Hinuma, Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP., *Peptides*, 27 (2006) 1073-1086.
- [10] T. Onaka, Y. Takayanagi, G. Leng, Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide., *Trends Endocrinol Metab*, 21 (2010) 287-293.
- [11] A. Marchese, M. Heiber, T. Nguyen, H.H. Heng, V.R. Saldivia, R. Cheng, P.M. Murphy, L.C. Tsui, X. Shi, P. Gregor, Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors., *Genomics*, 29 (1995) 335-344.
- [12] M.C. Lagerström, R. Fredriksson, T.K. Bjarnadóttir, D. Fridmanis, T. Holmquist, J. Andersson, Y.L. Yan, T. Raudsepp, R. Zoorob, J.P. Kukkonen, L.G. Lundin, J. Klovins, B.P. Chowdhary, J.H. Postlethwait, H.B. Schiöth, Origin of the prolactin-releasing hormone

- (PRLH) receptors: evidence of coevolution between PRLH and a redundant neuropeptide Y receptor during vertebrate evolution., *Genomics*, 85 (2005) 688-703.
- [13] Y. Lee, S.P. Yang, M.J. Soares, J.L. Voogt, Distribution of prolactin-releasing peptide mRNA in the rat brain., *Brain Res Bull*, 51 (2000) 171-176.
- [14] X. Zhang, D.C. Danila, M. Katai, B. Swearingen, A. Klibanski, Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor messenger ribonucleic acid in normal human pituitary and pituitary adenomas., *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (1999) 4652-4655.
- [15] K. Takahashi, A. Yoshinoya, Z. Arihara, O. Murakami, K. Totsune, M. Sone, H. Sasano, S. Shibahara, Regional distribution of immunoreactive prolactin-releasing peptide in the human brain., *Peptides*, 21 (2000) 1551-1555.
- [16] Y. Kataoka, N. Iijima, T. Yano, K. Kakiyama, S. Hayashi, S. Hinuma, H. Honjo, M. Tanaka, Y. Ibata, Gonadal regulation of PrRP mRNA expression in the nucleus tractus solitarius and ventral and lateral reticular nuclei of the rat., *Brain Res Mol Brain Res*, 87 (2001) 42-47.
- [17] R. Tokita, T. Nakata, H. Katsumata, S. Konishi, H. Onodera, J. Imaki, S. Minami, Prolactin secretion in response to prolactin-releasing peptide and the expression of the prolactin-releasing peptide gene in the medulla oblongata are estrogen dependent in rats., *Neurosci Lett*, 276 (1999) 103-106.
- [18] M. Maruyama, H. Matsumoto, K. Fujiwara, C. Kitada, S. Hinuma, H. Onda, M. Fujino, K. Inoue, Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain., *Endocrinology*, 140 (1999) 2326-2333.
- [19] B.L. Roland, S.W. Sutton, S.J. Wilson, L. Luo, J. Pyati, R. Huvar, M.G. Erlander, T.W. Lovenberg, Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery., *Endocrinology*, 140 (1999) 5736-5745.
- [20] H. Jarry, H. Heuer, L. Schomburg, K. Bauer, Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo., *Neuroendocrinology*, 71 (2000) 262-267.
- [21] C.B. Lawrence, F. Celsi, J. Brennand, S.M. Luckman, Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake., *Nat Neurosci*, 3 (2000) 645-646.
- [22] S.H. Lin, F.M. Leslie, O. Civelli, Neurochemical properties of the prolactin releasing peptide (PrRP) receptor expressing neurons: evidence for a role of PrRP as a regulator of stress and nociception., *Brain Res*, 952 (2002) 15-30.

- [23] P. Laurent, J.A. Becker, O. Valverde, C. Ledent, A. de Kerchove d'Exaerde, S.N. Schiffmann, R. Maldonado, G. Vassart, M. Parmentier, The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10., *Nat Neurosci*, 8 (2005) 1735-1741.
- [24] E. Valassi, M. Scacchi, F. Cavagnini, Neuroendocrine control of food intake., *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18 (2008) 158-168.
- [25] C.B. Lawrence, K.L. Ellacott, S.M. Luckman, PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling., *Endocrinology*, 143 (2002) 360-367.
- [26] K.L. Ellacott, C.B. Lawrence, N.J. Rothwell, S.M. Luckman, PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight., *Endocrinology*, 143 (2002) 368-374.
- [27] M. Bjursell, M. Lennerås, M. Göransson, A. Elmgren, M. Bohlooly-Y, GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity., *Biochem Biophys Res Commun*, 363 (2007) 633-638.
- [28] D.A. Bechtold, S.M. Luckman, Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice., *Endocrinology*, 147 (2006) 4723-4729.
- [29] Y. Takayanagi, H. Matsumoto, M. Nakata, T. Mera, S. Fukusumi, S. Hinuma, Y. Ueta, T. Yada, G. Leng, T. Onaka, Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents., *J Clin Invest*, 118 (2008) 4014-4024.
- [30] W. Gu, B.J. Geddes, C. Zhang, K.P. Foley, A. Stricker-Krongrad, The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice., *J Mol Neurosci*, 22 (2004) 93-103.
- [31] R.G. Boyle, R. Downham, T. Ganguly, J. Humphries, J. Smith, S. Travers, Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide., *J Pept Sci*, 11 (2005) 161-165.
- [32] J. Maixnerová, A. Špolcová, M. Pýchová, M. Blechová, T. Elbert, M. Rezáčová, B. Zelezná, L. Maletínská, Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor., *Peptides*, 32 (2011) 811-817.
- [33] C.J. Langmead, P.G. Szekeres, J.K. Chambers, S.J. Ratcliffe, D.N. Jones, W.D. Hirst, G.W. Price, H.J. Herdon, Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin

releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor., *Br J Pharmacol*, 131 (2000) 683-688.

[34] L. Maletínská, A. Spolcová, J. Maixnerová, M. Blechová, B. Zelezná, Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide., *Peptides*, 32 (2011) 1887-1892.

[35] H.Y. Yang, W. Fratta, E.A. Majane, E. Costa, Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (1985) 7757-7761.

[36] M. Findeisen, D. Rathmann, A.G. Beck-Sickinger, Structure-activity studies of RFamide peptides reveal subtype-selective activation of neuropeptide FF1 and FF2 receptors., *ChemMedChem*, 6 (2011) 1081-1093.

[37] N. Vyas, C. Mollereau, G. Chevé, C.R. McCurdy, Structure-activity relationships of neuropeptide FF and related peptidic and non-peptidic derivatives., *Peptides*, 27 (2006) 990-996.

[38] J.A. Bonini, K.A. Jones, N. Adham, C. Forray, R. Artymyshyn, M.M. Durkin, K.E. Smith, J.A. Tamm, L.W. Boteju, P.P. Lakhani, R. Raddatz, W.J. Yao, K.L. Ogozalek, N. Boyle, E.V. Kouranova, Y. Quan, P.J. Vaysse, J.M. Wetzel, T.A. Branchek, C. Gerald, B. Borowsky, Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF., *J Biol Chem*, 275 (2000) 39324-39331.

[39] K. Elhabazi, J.M. Trigo, C. Mollereau, L. Moulédous, J.M. Zajac, F. Bihel, M. Schmitt, J.J. Bourguignon, H. Meziane, B. Petit-demoulière, F. Bockel, R. Maldonado, F. Simonin, Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments., *Br J Pharmacol*, 165 (2012) 424-435.

[40] J.C. Chen, W.H. Lee, P.C. Chen, C.P. Tseng, E.Y. Huang, Rat NPFF(1) receptor-mediated signaling: functional comparison of neuropeptide FF (NPFF), FMRFamide and PFR(Tic)amide., *Peptides*, 27 (2006) 1005-1014.

[41] T. Murase, H. Arima, K. Kondo, Y. Oiso, Neuropeptide FF reduces food intake in rats., *Peptides*, 17 (1996) 353-354.

[42] D. Sunter, A.K. Hewson, S. Lynam, S.L. Dickson, Intracerebroventricular injection of neuropeptide FF, an opioid modulating neuropeptide, acutely reduces food intake and stimulates water intake in the rat., *Neurosci Lett*, 313 (2001) 145-148.

- [43] M.A. Cline, D.S. Mathews, Anorectic effects of neuropeptide FF are mediated via central mu and kappa subtypes of opioid receptors and receptor ligands., *Gen Comp Endocrinol*, 159 (2008) 125-129.
- [44] J.P. Devillers, H. Mazarguil, M. Allard, A.H. Dickenson, J.M. Zajac, G. Simonnet, Characterization of a potent agonist for NPFF receptors: binding study on rat spinal cord membranes., *Neuropharmacology*, 33 (1994) 661-669.
- [45] L. Prokai, K. Prokai-Tatrai, A. Zharikova, X. Li, J.R. Rocca, Combinatorial lead optimization of a neuropeptide FF antagonist., *J Med Chem*, 44 (2001) 1623-1626.
- [46] F. Simonin, M. Schmitt, J.P. Laulin, E. Laboureyras, J.H. Jhamandas, D. MacTavish, A. Matifas, C. Mollereau, P. Laurent, M. Parmentier, B.L. Kieffer, J.J. Bourguignon, G. Simonnet, RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 466-471.
- [47] Q. Fang, Z.L. Han, N. Li, Z.L. Wang, N. He, R. Wang, Effects of neuropeptide FF system on CB₁ and CB₂ receptors mediated antinociception in mice., *Neuropharmacology*, 62 (2012) 855-864.
- [48] L. Moulédous, C. Mollereau, J.M. Zajac, Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system., *Biofactors*, 36 (2010) 423-429.
- [49] Y.Q. Wang, J. Guo, S.B. Wang, Q. Fang, F. He, R. Wang, Neuropeptide FF receptors antagonist, RF9, attenuates opioid-evoked hypothermia in mice., *Peptides*, 29 (2008) 1183-1190.
- [50] L. Ma, D. MacTavish, F. Simonin, J.J. Bourguignon, T. Watanabe, J.H. Jhamandas, Prolactin-releasing peptide effects in the rat brain are mediated through the Neuropeptide FF receptor., *Eur J Neurosci*, 30 (2009) 1585-1593.
- [51] Q. Fang, Y.Q. Wang, F. He, J. Guo, Q. Chen, R. Wang, Inhibition of neuropeptide FF (NPFF)-induced hypothermia and anti-morphine analgesia by RF9, a new selective NPFF receptors antagonist., *Regul Pept*, 147 (2008) 45-51.
- [52] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.

- [53] H. Motulsky, R. Neubig, Analyzing radioligand binding data., Curr Protoc Neurosci, Chapter 7 (2002) Unit 7.5.
- [54] Y. Cheng, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction., Biochem Pharmacol, 22 (1973) 3099-3108.
- [55] L. Maletínská, J. Maixnerová, R. Matysková, R. Haugvicová, E. Sloncová, T. Elbert, J. Slaninová, B. Zelezná, Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12., Eur J Pharmacol, 559 (2007) 109-114.
- [56] www.uniprot.org, in.
- [57] B. Meister, Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight., Physiol Behav, 92 (2007) 263-271.
- [58] A. Kimura, M. Ohmichi, K. Tasaka, Y. Kanda, H. Ikegami, J. Hayakawa, K. Hisamoto, K. Morishige, S. Hinuma, H. Kurachi, Y. Murata, Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase., J Biol Chem, 275 (2000) 3667-3674.
- [59] Y.Q. Wang, S.B. Wang, J.L. Ma, J. Guo, Q. Fang, T. Sun, Y. Zhuang, R. Wang, Neuropeptide FF receptor antagonist, RF9, attenuates the fever induced by central injection of LPS in mice., Peptides, 32 (2011) 702-706.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka